

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

COLLOQUE ANNUEL
DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

10 janvier 1961

Les problèmes actuels de l'identification
des *Pseudomonas*, des *Achromobacter*,
et de bactéries analogues

sous la Présidence du Professeur ROBERT FASQUELLE.

SOMMAIRE

ROBERT FASQUELLE : Prologue	7
L. ENJALBERT : Problèmes actuels de l'identification des <i>Pseudomonas</i> , des <i>Achromobacter</i> et des bactéries analogues	10
MICHEL VÉRON : <i>Pseudomonas</i> pigmentés	16
R. BUTTIAUX : <i>Pseudomonas</i> non pigmentés et <i>Achromobacter</i>	43
P. THIBAUT : A propos d' <i>Alcaligenes faecalis</i>	59
M. PIÉCHAUD : Le groupe <i>Moraxella</i> . A propos des B5W- <i>Bacterium</i> <i>anitratum</i>	74
J. BRISOU (avec la collaboration technique de H. JARRIAULT et B. MOU- LIN) : Etude antigénique des <i>Achromobactereae</i>	86
Y. CHABBERT et A.-L. COURTIEU : La sensibilité aux antibiotiques des <i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> et « B5W- <i>Bacterium anitratum</i> »	100
Discussion	114
A.-L. COURTIEU, SUZANNE CHASSIGNOL et CÉCILE LONGERAY : Caractères bactériologiques de 214 souches de <i>Moraxella lwoffii</i> et de <i>M. glucido-</i> <i>lytica</i> (<i>Acinetobacter</i>)	116

Digitized by the Internet Archive
in 2024

PROLOGUE

par Robert FASQUELLE.

(Faculté de Médecine)

Depuis son apparition sur la terre, l'homme est en butte aux infections, comme les animaux. Mais lui, il se demande : « Pourquoi ? ».

Pendant longtemps, aucune réponse ne fut donnée à la question : les maladies exogènes n'étaient pas distinguées des maladies endogènes. On ne parlait que de tempéraments : tempéraments bilieux, sanguin, lymphatique, nerveux, tempérament fiévreux enfin, ce dernier englobant ce qui devait plus tard appartenir à la pathologie infectieuse.

Puis vinrent Louis Pasteur et Robert Koch : ce fut le temps des microbes. On voulut tout expliquer par ces « petits êtres ». Le terrain sombrait dans l'oubli.

Il en fut rapidement tiré, Pasteur Vallery-Radot ne nous a-t-il pas, en effet, montré comment Pasteur lui-même, au moment où il établissait la théorie des germes, insistait déjà sur le rôle capital du terrain dans le déclenchement des maladies des vers à soie comme dans l'apparition du « typhus des camps » [1] ?

Ainsi en arrivait-on peu à peu à la conception que la maladie infectieuse est la manifestation de la lutte entre un organisme et une souche de germes qui essaie de l'envahir.

Quatre éventualités théoriques pouvaient donc être décrites : organisme en pleine force, germes non-virulents ; organisme en pleine force, germes virulents ; organisme déficient, germes virulents ; organisme déficient, germes non virulents.

La première est sans intérêt : c'est le cas de la petite plaie accidentelle du tégument, à l'occasion de laquelle pénètrent dans le tissu conjonctif quelques germes saprophytes de l'air, du sol ou des eaux. L'organisme réagit par une discrète inflammation ; les phagocytes bloquent les germes et les résorbent. Il s'agit d'un des aléas de la vie courante, dont la manifestation reste souvent au-dessous des perceptions cliniques.

De la seconde éventualité (un organisme en pleine force, des germes virulents), l'exemple classique était celui du chirurgien,

qui, se blessant au cours d'une intervention septique, faisait dans les heures suivantes, une septicémie foudroyante.

La troisième (un organisme déficient, des germes virulents) était la plus fréquente et la plus redoutable. Ainsi les fièvres puerpérales contagieuses des jeunes accouchées. La fatigue de la grossesse et de l'accouchement rendait compte de la déficience du terrain. Le défaut d'asepsie, la promiscuité de la salle commune expliquaient la transmission de femme à femme d'un streptocoque dont la vitesse de multiplication augmentait au fur et à mesure des passages.

Quant à la quatrième éventualité (un organisme déficient, infecté par des germes non virulents), elle ne se rencontrait pas ; à chaque fois en effet des germes virulents prenaient le pas sur les germes non virulents, qui, ainsi, n'avaient pas l'occasion de se manifester.

Depuis que les antibiotiques existent, la situation a été totalement modifiée, sauf pour la première éventualité, toujours sans intérêt. En effet, les deuxième et troisième, elles, ont presque complètement disparu. Car les antibiotiques, par leur action bactériostatique (ou mieux encore par leur action bactéricide) effacent la virulence des germes ; ils les mettent en phase de latence ; et comme les germes virulents au départ sont des germes évolués, spécialisés, incapables, en raison même de cette spécialisation, de s'adapter à une chaîne métabolique autre que celle que bloque l'antibiotique, ils sont définitivement vaincus, victimes désormais de la phagocytose et de la bactériopexie des cellules du tissu réticulo-endothélial. Ainsi ont été chassées de la scène clinique les infections graves à germes virulents.

C'est évidemment la quatrième éventualité qui se trouve placée au premier plan, celle où sur un organisme déficient entrent en action des germes non virulents. Elle est aujourd'hui observée à tout instant : dans les services de traumatologie, de réanimation, de chirurgie cardiaque, chez les brûlés, les intoxiqués, les diabétiques, en gériatrie comme en pédiatrie, dans les services de prématurés.

Et les cliniciens de se tourner vers les microbiologistes et de leur adresser deux reproches : 1° Pourquoi ne mettez-vous pas à notre disposition des antibiotiques actifs sur les germes non ou peu virulents ? 2° Pourquoi, quand un de ces germes non ou peu virulent est isolé, si nous nous adressons à deux microbiologistes différents pour l'identifier, chacun d'eux lui attribue-t-il un nom différent [2] ?

Le premier point est certes le plus important. Parler de terrain esquisse ou esquive la réponse. Il appartiendrait à la physiologie

comparée des germes et des organismes de lui donner une signification biochimique.

Quant à la seconde question, assez vexante pour les microbiologistes, c'est à elle qu'est consacré le Colloque d'aujourd'hui, au moins en ce qui concerne les *Pseudomonas*, les *Achromobacter* et les « bactéries analogues ». Simple problème de taxonomie (ou, plus correctement, de taxinomie, si nous en croyons les D^{rs} Littré et Brisou [3]), objecteront certains. Mais n'est-il pas important d'essayer de se mettre d'accord pour appeler du même nom un même germe ? Y réussirons-nous aujourd'hui ? J'en doute quelque peu. Il appartiendrait alors à la Société Française de Microbiologie de prendre une mesure énergique : nommer une Commission chargée de lui proposer une décision à ce sujet...

Il me reste, mesdames et messieurs, une bien agréable mission à remplir, celle de remercier nos collègues de Lille, de Toulouse, de Lyon, de Poitiers et de Paris d'avoir bien voulu répondre à notre appel pour ce Colloque, et de leur donner la parole.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Pasteur VALLERY-RADOT. Quelques considérations sur l'œuvre de Pasteur, *Presse méd.*, 1933, **41**, 1871.
 - [2] *Colloque de Microbiologie médicale. Pathologie et Biologie*, 1960, **8**, 1415.
 - [3] LITTRÉ (E.). *Dictionnaire de la langue française*. Réédit. Gallimard-Hachette, 1958, **7**, 785.
-

PROBLÈMES ACTUELS DE L'IDENTIFICATION DES *PSEUDOMONAS*, DES *ACHROMOBACTER* ET DES BACTÉRIES ANALOGUES

par L. ENJALBERT.

(Faculté de Médecine, Toulouse)

Les médecins occupés par la pathologie et la bactériologie de l'homme sont depuis longtemps habitués à y englober les maladies infectieuses et les germes venus des animaux, ces vecteurs constamment incriminés.

Mais notre bactériologie médicale craint son ignorance en face des difficultés de la phytobactériologie, de la microbiologie du sol, de la bactériologie des fonds marins ou des pétroles. Dans ce domaine très scientifique, elle ne cherche pas à s'aventurer et demande quelquefois ses solutions médicales à des chercheurs préoccupés d'autres problèmes que celui du diagnostic clinique. A la lumière des recherches qui lui sont étrangères, nos problèmes de bactériologie médicale apparaissent parfois comme ces rangements nouveaux d'objets anciens éclairés sous un angle inattendu.

Les rapports que nous allons entendre sur les *Pseudomonas*, *Achromobacter* et ces malheureuses bactéries anonymes et « analogues » sont des travaux importants pour la médecine humaine, et je souhaite qu'en conclusion nous puissions ensemble, proposer pour des problèmes réels des solutions pratiques.

Comme *bactériologiste*, ces germes m'intéressent chaque fois que je les rencontre, par leur ubiquité, leur variété et les difficultés de leur identification, malgré la base de travail solide qu'est la classification de Prévot. En tant que *médecin*, cette rencontre devient fréquente, et chaque fois les problèmes cliniques sont si divers que leur intérêt augmente encore.

Ces germes sont dangereux pour l'homme. Notre but est de savoir dans quelles conditions le danger existe. Seuls des travaux bactériologiques précis peuvent nous y conduire.

Nous savons que ces bactéries sont capables d'infecter l'homme depuis Gessard, mais Charrin après avoir étudié le bacille pyocyanique pendant huit ans lui reconnaît un grand intérêt scientifique, mais déclare que sa place en pathologie humaine est insignifiante.

En 1949, Turpin [28], en France, rapporte un cas d'une affection exceptionnelle, la septicémie à bacille pyocyanique de Gessard.

En mai 1950, Debré [41], en publie 12 observations nouvelles.

Le départ est donné à une suite d'observations qui se succèdent : à Bordeaux en 1955, par Verget et Bentegeat [29], à Strasbourg en 1957 par Lütz [48], aux U. S. A. [49], en Italie [26] et à Toulouse en 1960 [24].

En 1950, Martin et Sureau [20] surprennent par la publication de deux méningites inconnues, à *M. lwoffii*. Mais en 1958, Brisou après avoir étudié les « Chromobactérioses » peut commencer à faire la synthèse des « Achromobactérioses » humaines.

Nous avons eu l'opportunité d'étudier, avec Kambou [47, 44], une série de méningites aiguës, d'inoculation certaine, à *Acinetobacter lwoffii*.

Buttiaux et Vandepitte [9] décrivent des méningites épidémiques du nouveau-né, dues à *Flavobacterium meningosepticum*, germe retrouvé par Miss King aux U. S. A. dans les mêmes conditions cliniques.

Mollaret et Chamfeuil [21] observent en 1958 avec un intérêt inquiet 15 souches du vieux bacille *prodigiosus* (*Serratia marcescens*) isolé chez l'homme, et pathogène pour l'animal de laboratoire.

Tout travail de bactériologie humaine ou épidémiologique cite désormais les *Pseudomonas* et *Achromobacter*.

Ils sont présents dans la flore normale des muqueuses chez l'homme (Dubos) et sur la conjonctive de 15 p. 100 des sujets sains [22]. Ils sont rencontrés dans les lacs sahariens [5], dans les eaux marines, dans les estuaires de fleuves français [6], chez les poissons d'eau douce, les grenouilles, les animaux marins [7], dans le sol de l'Institut de Physiologie Végétale de Varsovie [4].

Il suffit de les chercher pour les rencontrer autour des malades dans les bouilloires, les pansements humides, les liquides conservateurs, les biberons, les appareils à aérosols, les filtres du rein artificiel, les ampoules et flacons ouverts un matin conservés avec précaution à + 4° pour emploi ultérieur. Buttiaux les retrouve dans les brise-jet d'une canalisation d'eau, nous les isolons d'un manomètre de Claude, des canalisations d'eau dans les blocs opératoires.

L'étude des contrôles de stérilité au Centre de Transfusion de l'Armée [3] et au Laboratoire National de la Santé publique [12] révèle que la flore aérobie des souillures rencontrées a changé depuis quelques années. Elle n'est plus faite seulement de germes Gram +, mais souvent de bactéries Gram —, qui sont des *Pseudomonas*, *Achromobacter*.

Les auteurs canadiens les retrouvent dans l'air au-dessus de l'Océan Atlantique, et pensent que la France tout entière ne peut qu'être ennuyée, bactériologiquement, par la flore de ses vents dominants.

L'homme est un excellent milieu de culture pour *Pseudomonas* et *Achromobacter*. Berk et Nelson [2], étudiant récemment les mécanismes de l'immunité cellulaire, ont utilisé *Ps. aeruginosa*. Dans l'appareil de Warburg, la consommation d'oxygène de la bactérie augmente de 4 à 500 fois en présence de cellules ou d'extrait cellulaire de mammifère. Traité auparavant par des antiseptiques et très amoindri, le germe semble « ressusciter », disent les auteurs, au contact des cellules de mammifères.

Pour ces germes ubiquitaires, nous savons que l'homme est un milieu favorable, mais peu accessible en raison de ses défenses efficaces.

Depuis peu nous devons compter avec un facteur nouveau : l'homme transformé bactériologiquement parlant, par les progrès de l'hygiène et de la thérapeutique.

L'hygiène rigoureuse raréfie les germes autour de l'être humain dans les pouponnières de prématurés ou de nourrissons, dans les services où se traitent les grands brûlés par exemple. La thérapeutique antibiotique balaie la flore normale des muqueuses en même temps qu'elle détruit les vrais pathogènes contre lesquels elle est dirigée. Mais elle laisse souvent persister des *Pseudomonas* et *Achromobacter* particulièrement peu sensibles ou facilement résistants.

De toute manière, l'homme pose alors des problèmes bactériologiques qui ne sont pas sans rappeler ceux rencontrés dans les élevages d'animaux stériles.

L'actualité, c'est cette pathologie qui s'amplifie depuis dix ans devant nous et par nous.

Le clinicien et le bactériologiste doivent devenir capables de la reconnaître vite et sûrement.

L'infection médicale *spontanée* est classique pour *Achromobacter alcaligenes* sous ses formes pseudo-typhoidiques, pseudo-rhumatisme articulaire aigu [8, 15]. Les septicémies à *Pseudomonas*, les méningites suppurées à *Acinetobacter* sont classiques aussi. Les suppurations chirurgicales et ORL à « pus bleu » sont le point de départ de toute cette bactériologie. La pathologie de *pullulation* chez les humains traités par les antibiotiques préoccupe tous les cliniciens : maladie d'Osler à streptocoques et traitée correctement par pénicilline + streptomycine, que termine tragiquement une septicémie à pyocyanique ; pneumopathies, suppurations, syndromes cholériformes chez les convalescents de

neurotoxiques diverses dans les services de nourrissons ; infection pulmonaire des trachéotomisés dans les Centres de Réanimation, etc.

Redoutable aussi la pathologie d'*inoculation* est certaine, variée, souvent grave : méningite aiguë après ponction lombaire ou intervention chirurgicale [4, 14] ; septicémie compliquant une endoscopie rénale [27] ou aggravant l'ablation et la marsupialisation d'un kyste hydatique [24].

Les infections humaines à *Pseudomonas* et *Achromobacter* demandent au bactériologiste quelque rigueur :

Il doit *multiplier* les prélèvements et les examens. Avant d'accorder à un germe une valeur quelconque, il faut l'avoir retrouvé plusieurs fois identique à lui-même.

Il doit apprécier la *quantité*, même approchée, des germes dans les prélèvements :

Chez l'homme, une colonie d'*Acinetobacter* dans une culture de gorge n'a aucune signification, alors qu'elle prend une valeur considérable dans une culture de L. C. R.

Un prématuré supporte quelques *Pseudomonas* dans son tube digestif, mais leur présence abondante évoque un danger réel.

Il doit enfin s'assurer que le nombre des germes rencontrés n'est pas un artefact. Tout matériel est à ensemercer le plus tôt possible après le prélèvement comme lorsqu'il s'agit de cultiver des germes fragiles. Ici, ce n'est pas la fragilité qui est à craindre, mais la pullulation trompeuse et facile dans le prélèvement lui-même.

Lorsqu'il fait appel au bactériologiste, le médecin, en face de syndromes cliniques peu évidents, demande :

- 1° s'il existe chez son malade des germes dangereux ;
- 2° comment les détruire ;
- 3° et — par courtoisie — comment ils se nomment.

L'expérience aidant, ces bactéries sont partiellement reconnues à leur morphologie, à leurs colonies, à leur galerie « muette », ou leur pigment. Les directives de l'antibiogramme peuvent, fort heureusement pour le malade, précéder l'identification totale. Mais, s'il respecte les règles théoriques, le bactériologiste s'obligera parfois à quinze à vingt jours d'une observation minutieuse devant un *Acinetobacter* ou un *Achromobacter*, pour l'identifier.

Ce domaine très scientifique de la bactériologie devrait s'adapter davantage à son rôle médical. Que de bactéries à réexaminer d'un œil critique sont inscrites dans les manuels de bactériologie et circulent dans les collections internationales utilisées par tous !

Hemophilus paraptertussis n'a rien d'un *Hemophilus*. Il provoque chez l'enfant une trachéite et pourrait aussi bien être un de ces *Acinetobacter* uréase + comme nous les avons rencontrés en pathologie bronchique ou surinfection cutanée. *Hemophilus bronchosepticus*, devenu *Brucella bronchoseptica*, incapable de donner la moindre fièvre de Malte, a une morphologie et une galerie d'*Achromobacter* mobile, uréase +, hémagglutinant.

En face des *Pseudomonadeae*, des *Achromobactereae*, des *Chromobactereae*, nous ne pouvons plus être lents ou incertains, puisque nous savons qu'ils sont quelquefois dangereux. Il faut une réponse plus rapide, des techniques plus standardisées de reconnaissance bactériologique efficace. Seules des réunions comme celles d'aujourd'hui pourront nous mener à ce but.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BASSALIK (L.), JANOTA-BASSALIK (L.) et BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 165-169.
- [2] BERK (R.), NELSON (E. L.) et PICKETT (M. J.). *J. inf. Dis.*, 1960, 107-183.
- [3] BONNEL (P. H.) et RABY (C.). *Compte Rendu Troisième Rencontre Internationale de Standardisation Biologique*, 2-6 septembre 1957, Opatija, Yougoslavie.
- [4] BOUDIN (G.), BARBIZET (J.) et GUÉRIN (C.). *Bull. Semaine Hôp. Paris*, 1955, **31**, 26.
- [5] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 450.
- [6] BRISOU (J.), MÉNANTAUD () et DOUBLET (M.). *Bull. Inst. Océanographique*, MONACO, 28 octobre 1958, n° 1129.
- [7] BRISOU (J.), TYSSET (C.) et FLEURY (R.). *Bull. Centre Etudes Rech. scient. Biarritz*, 1959, **2**, 577.
- [8] BRISOU (J.). *Rev. Path. gén. Physiol. clin.*, 1958, **695**, 211-232.
- [9] BUTTIAUX (R.) et VANDEPITTE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 398-404.
- [10] *Colloque annuel Soc. Franç. Microb. : Evolution des bactéries et de l'aspect des infections sous l'influence des antibiotiques ; Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 1-101.
- [11] DEBRÉ (R.), MOZZICONACCI (P.) et CAMIS (M.). *Bull. Sem. Hôp. Paris*, 1950, **26**, 1918.
- [12] DESBORDES (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960 **98**, 236-241.
- [13] EHRHARDT (J. P.). *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1960.
- [14] ENJALBERT (L.) et BRISOU (J.). *Pathol. Biol.*, 1960, **8**, 1423-1430.
- [15] ENJALBERT (L.), LAPCHINE (L.) et TRAN VAN THO. *Toulouse médical*, 1957, **1**, 45-60.
- [16] HOYNE (A. L.), METRICK (S.) et SAKUMA (T.). *J. Pediatr.*, 1958, **52**, 708-711.
- [17] KAMBOU (A. K.). *Thèse Pharmacie*, Toulouse, 1959.
- [18] LÜTZ (A.), SCHAEFFER (A.) et HOFFERER (H. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 49-61.

- [19] MARTIN (W. J.), SPITTEL (J.), GERACI (J.) et WELLMANN (W.). *Proc. Staff Meet. Mayo Clinic*, 1954, **29**, 562-566.
 - [20] MARTIN (R.), SUREAU (B.), BARME (Cl.), LENER (G.) et HOUSSE (H.). *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1950, **66**, 1764.
 - [21] MOLLARET (P.) et CHAMFEUIL (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 643-652.
 - [22] ORFILA (J.) et COURDEN (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 929-932.
 - [23] PELOUX (Y.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1959, **52**, 166 ; *Presse méd.*, 1959, **67**, 1121.
 - [24] PETEL (C.). *Thèse Médecine*, Toulouse, 1960, n° 59.
 - [25] RAUTLIN DE LA ROY (Y.). *Thèse Médecine*, Toulouse, 1960, n° 101.
 - [26] ROTTINI (G. O.). *Minerva pediatr.*, 1959, **44**, 1193-1206.
 - [27] TERQUEM (J.), TESTAS (P.) et PREYSSAS (J.). *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1958, **74**, 105-108.
 - [28] TURPIN (R.) et BOUREL (M.). *Pédiatrie*, 1948, **3**, 613-623.
 - [29] VERGET (P.) et BENTEGEAT (J.). *Le Nourrisson*, 1955, **43**, 141.
 - [30] WRIGHT (J.). *British med. J.*, 1951, **41**, 138.
-

PSEUDOMONAS PIGMENTÉS

par Michel VÉRON.

(Institut Pasteur)

Les *Pseudomonas* sont parmi les germes les plus souvent rencontrés dans un laboratoire de bactériologie : outre leur rôle considérable en biologie et pathologie végétales et marines, rôle qui ne sera pas étudié ici, leur fréquence dans les produits biologiques, les denrées alimentaires et les eaux, la possibilité pour une ou deux espèces au moins d'être pathogènes pour l'homme et les animaux à sang chaud, et leur grande résistance aux antibiotiques, rendent indispensable leur étude approfondie.

L'espèce type du genre, *Pseudomonas aeruginosa*, est l'espèce la plus commune rencontrée dans les laboratoires à orientation médicale ; une autre espèce, *Ps. fluorescens*, est également très fréquente. Nous nous limiterons au moins pour le moment, à la description de ces deux espèces, dont les caractères ont été très étudiés et qui servent de base à la définition du genre *Pseudomonas*. Ces deux espèces ont en commun d'élaborer dans le milieu de culture des pigments hydrosolubles particuliers qui ont servi depuis longtemps à les reconnaître. D'autre part, leurs propriétés constituent une référence solide pour la classification des bactéries voisines qui seront étudiées dans les rapports suivants.

TECHNIQUE D'ÉTUDE DES *Pseudomonas*

Le diagnostic de ces deux espèces de *Pseudomonas* repose sur un ensemble de caractères dont certains sont essentiels à connaître. Mais ces bactéries demandent des techniques d'étude qui parfois sont assez différentes des méthodes courantes, utilisées par exemple pour les Entérobactéries, et dont nous passerons en revue les principales.

MORPHOLOGIE.

L'étude de la morphologie constitue la base de toute classification valable, dans la mesure où elle reste constante au cours de la vie du microbe.

Les *Pseudomonas* sont des bacilles en fins bâtonnets, d'environ $0,5\ \mu$ de diamètre, en général rectilignes, quoique les formes légèrement incurvées ne soient pas rares dans les cultures. Les extrémités sont finement arrondies, parfois un peu effilées. La longueur des bactéries est très variable, entre 1 à $3\ \mu$ en général ; des formes filamenteuses se voient dans les vieilles cultures.

Ce sont des bactéries très mobiles lorsqu'on les examine entre lame et lamelle. Il faut signaler toutefois que dans les produits pathologiques et dans certaines cultures âgées, la mobilité de ces bactéries peut être gênée par une substance visqueuse, fréquente surtout chez *Ps. fluorescens* [60, 38], et qu'on reconnaît facilement aux traînées qu'elle fait dans la préparation. Dans ce cas, pour mettre en évidence la mobilité des bactéries, on peut tout simplement faire une suspension épaisse du matériel muqueux dans un peu d'eau distillée stérile, centrifuger à vitesse modérée, puis laisser au repos ; après quelques instants, on examine entre lame et lamelle le liquide surnageant qui contient les bactéries les moins muqueuses et les plus mobiles.

La mobilité en culture doit être recherchée en ensemençant par piqûre centrale un tube de gélose molle (bouillon nutritif gélosé à 0,3 ou 0,4 p. 100) ; la mobilité ne pouvant sans doute apparaître qu'en présence d'oxygène [63], il est donc indispensable de ne pas capuchonner les tubes. Incuber à 20 ou 30° C pendant six à dix-huit heures. Certaines souches étant très avides d'oxygène, les bactéries inoculées le long de la piqûre d'ensemencement ne cultiveront pas, ou bien la culture ne diffusera pas, et la souche sera à tort considérée comme immobile ; cette mauvaise interprétation doit être connue, et l'on s'attachera à reconnaître la mobilité de ces souches soit sous forme d'une culture en disque située à 1 ou 2 mm sous la surface — disque plan ou en dôme évoquant un « parapluie » — soit sous forme d'un léger trouble du milieu diffusant à partir d'une culture située exclusivement, au début, à la surface du milieu. Dans tous les cas difficiles, un examen entre lame et lamelle est indispensable. L'absence de culture dans la profondeur de la gélose molle, signalée également par Leifson [48], est peut-être à l'origine de la description de souches ciliées et immobiles (Moore et Pickett, [55]).

Si une souche paraît immobile à l'isolement, et qu'on la suppose mobile, on pourra exalter cette mobilité en inoculant la souche au centre d'une gélose molle à 0,3 p. 100 coulée en boîte de Petri. Après seize heures de culture à 30° C, on examine entre lame et lamelle la zone périphérique de la culture.

La mobilité de la bactérie est un caractère essentiel des *Pseudomonas*. Elle est en rapport avec une ciliature exclusivement polaire.

La coloration des cils est désormais entrée dans la pratique courante du laboratoire grâce à des techniques facilement utilisables. Plutôt qu'aux techniques plus anciennes et délicates de Casarès-Gill [41] et de Levenson [49], nos préférences vont aux techniques récentes décrites par Leifson [46] et par Rhodes [60]. La technique de Leifson, exécutée selon la méthode de Piéchaud [58], c'est-à-dire en remplaçant la solution de sels de rosaniline à 1,2 p. 100 par une solution alcoolique saturée de fuchsine basique, nous donne toute satisfaction. Les souches muqueuses peuvent être traitées par centrifugation (Cf. ci-dessus) pour mieux mettre en évidence leur ciliature.

Toutes nos souches de *Pseudomonas*, examinées dans des cultures de six à dix-huit heures à 30° C, ont une ciliature polaire. *Ps. aeruginosa* est le plus souvent monotriche ; parfois, il présente un cil polaire qui se sépare en deux à une certaine distance de la cellule, cette image pouvant d'ailleurs n'être qu'un artefact dû à la technique de coloration. Par contre, *Ps. fluorescens* peut avoir un ou plusieurs cils polaires. Ces aspects sont en accord avec les images obtenues par coloration et par examens au microscope électronique par Rhodes [60], Buttiaux et Gagnon [7] et Klinge [38]. Les bactéries présentant une ciliature polaire à leurs deux extrémités sont des formes de prédivision, où l'on voit souvent l'amorce d'un étranglement sur le corps bacillaire : ceci a d'ailleurs été confirmé par les travaux de Jacherts [33] montrant que les flagelles n'apparaissent que chez la cellule fille.

Selon la terminologie de Leifson [48], les cils de ces bactéries sont « normaux », c'est-à-dire qu'ils dessinent une courbe sinusoïdale dont l'amplitude est égale (ou souvent inférieure) à la demi-longueur d'onde. Les variations de la ciliature au cours de la vie des microbes n'ont jamais été signalées chez les *Pseudomonas* ; leur existence chez d'autres bactéries est envisagée dans un autre rapport (Thibault [73]).

Après coloration, *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* apparaissent comme des bactéries Gram-négatives, souvent plus intensément colorées aux deux pôles ; des formes granuleuses ou « barrées » sont assez fréquentes chez *Ps. aeruginosa* dans les produits pathologiques. Des formes en filaments ou en rubans se voient dans les vieilles cultures. Il n'y a jamais de spores.

Les souches muqueuses à l'isolement de *Ps. aeruginosa* peuvent présenter de petites capsules, bien visibles entre lame et lamelle en présence d'encre de Chine. En général, seulement 1 à 5 p. 100 des bactéries sont capsulées, et il est curieux de constater parfois qu'un seul bacille soit capsulé dans une chaînette de 3 à 5 cellules. La participation d'une faible proportion de cellules dans une colonie de *Ps. fluorescens* à l'élaboration d'une substance muqueuse a été signalée également dans plusieurs travaux

(Ørskov [56], Rhodes [64]). Il faut noter toutefois que, sauf artifices spéciaux, le caractère muqueux, tant des colonies que des cellules bactériennes, se perd très vite dans les subcultures, alors que la substance visqueuse interstitielle peut subsister.

Selon les conditions et les milieux de culture, les colonies des différentes espèces de *Pseudomonas* subissent des variations morphologiques importantes pour une même souche, et la description de ces colonies, malgré l'essai de systématisation fait par Gaby [21], ne peut donc servir à des fins taxinomiques.

TEMPÉRATURE DE CULTURE.

La culture des *Pseudomonas* pose un problème préalable important qui est celui de la température d'incubation. Les cultures de *Ps. aeruginosa* se font classiquement à 37° C, tandis qu'à cette température *Ps. fluorescens* ne cultive généralement pas, la température optimum de cette espèce se situant généralement entre 20 et 30° C.

Dans des limites assez larges, la température d'incubation semble n'influencer que peu l'allure de la courbe et le rendement de la croissance ; par contre, elle peut avoir une influence notable sur la synthèse, la diffusion dans le milieu, ou l'activité des enzymes bactériennes. Ce fait, bien connu chez les Entérobactéries, vient d'être souligné par Alford [4] chez les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Achromobacter*. Pour des raisons de commodité, nous avons adopté, pour l'étude de tous les *Pseudomonas*, la température de 30° C, température qui convient aussi bien aux souches de *Ps. aeruginosa* isolées de l'homme qu'à la plupart des souches de *Ps. fluorescens* venant du milieu extérieur. Seules, quelques souches psychrophiles devront être isolées à 20° C, mais elles pourront ensuite, le plus souvent, être étudiées à 30° C. Il nous semble, en effet, préférable de baser une taxinomie sur une étude faite dans des conditions standardisées, plutôt que d'étudier chaque souche à une température égale à celle de son environnement d'origine, ce qui peut entraîner des interprétations très fantaisistes.

Une autre température doit être essayée systématiquement pour la culture des *Pseudomonas*, celle de $41 \pm 1^\circ$ C, ou 42° C si la précision du thermostat est meilleure ; cette température, étudiée d'abord par Seleen et Stark [66], a été proposée ensuite par Haynes [30] pour différencier *Ps. aeruginosa*, qui cultive à 42° C, et *Ps. fluorescens*, qui ne cultive pas à cette température. Il s'agit d'une épreuve fondamentale, qui permet de diviser nettement les *Pseudomonas* en deux groupes ; nous n'avons trouvé aucune souche de *Ps. aeruginosa* qui ne cultivât pas à cette température de 42° C.

Cette épreuve doit être réalisée de préférence sur une gélose inclinée ensemencée en strie, la totalité de la culture étant immergée dans un bain-marie à réglage précis. En cas de culture positive, on peut ainsi contrôler si la culture s'est réalisée à partir de l'ensemble de la population microbienne ou seulement à partir de quelques variants thermo-résistants qui donnent alors des colonies isolées dans le tube. Avec *Ps. aeruginosa*, on obtient une culture abondante sur toute la strie d'ensemencement.

PIGMENTATION.

Ps. aeruginosa produit habituellement en culture une pigmentation très spéciale diffusant dans le milieu, due essentiellement à deux pigments hydrosolubles se distinguant par certaines de leurs propriétés.

Le premier pigment, la pyocyanine, est bleu, soluble dans l'eau et le chloroforme. C'est un dérivé de la phénazine (Wrede [81]). En solution aqueuse, la pyocyanine est un indicateur de pH (bleu en milieu alcalin, rouge en milieu acide), et un indicateur d'oxydo-réduction (se décolore au-dessous de $-0,05$ volts). Sa production en culture est inhibée, notamment, par les ions phosphate et surtout Na^+ .

Le deuxième pigment est vert fluorescent, soluble dans l'eau, mais pas dans le chloroforme. La nature chimique de ce pigment, que Turfreijer (cité par Elliott [47]) proposa de nommer pyoverdine est mal connue : c'est aussi un corps azoté (Turfitt [75]), mais il semble se dénaturer lors des essais d'extraction, et ses spectres d'absorption et d'émission en lumière ultraviolette se modifient en fonction du pH (Elliott [47]). C'est aussi un indicateur de pH et d'oxydoréduction. Les solutions acides de pyoverdine sont incolores et non fluorescentes, mais redeviennent jaune-brun et fluorescentes sous l'action des alcalis. D'autre part, la pyoverdine ne prend naissance dans les cultures que si le potentiel d'oxydo-réduction est supérieur à $-0,30$ volts (Elliott [47]), et si le milieu ne contient pas de fer (Paton [57]).

Ces deux pigments peuvent être oxydés respectivement en pigments jaunâtres (pyoxanthose) ou brun-rouge (pyorubine), dont la coloration change également en fonction du pH, de la même manière que les pigments dont ils dérivent.

On rencontre plus rarement deux variétés de *Ps. aeruginosa*, mélanogène et érythrogène, caractérisées respectivement par une pigmentation brun noirâtre et rougeâtre de la culture. Ces colorations sont insensibles aux variations de pH (Simon [67]), contrairement aux pigments précédents.

Gessard fut le premier à étudier la pigmentation de *Ps. aeruginosa* en culture. Cette pigmentation étant très variable en qualité

et quantité selon les souches, il proposa d'utiliser trois milieux d'épreuves (macération de viande, eau peptonée et gélose-glycérol-peptone pancréatique) pour différencier les variétés pigmentaires du bacille pyocyanique ; toutes les souches doivent donner, au moins sur le troisième milieu d'épreuve, de la pyocyanine, mise en évidence au besoin grâce à sa solubilité dans le chloroforme (Cf., par exemple, Gessard [25]). L'intérêt des milieux d'épreuve de Gessard fut encore confirmé récemment par le travail de Simon [67].

C'est dans la même ligne de recherches que King, Ward et Raney [35] proposèrent deux milieux empiriques, destinés à favoriser l'élaboration dans les cultures de la pyocyanine (milieu A) et du pigment fluorescent (milieu B). La formule de ces milieux est la suivante :

Milieu A (pyocyanine) : Bactopeptone (Difco), 2 g ; Bacto-agar, 1,5 g ; glycérol, 1 g ; K_2SO_4 (anhydre), 1 g ; $MgCl_2$ (anhydre), 0,14 g ; eau, q. s. p. 100 ml. Ajuster (avec KOH) à pH 7,2 et filtrer sur papier.

Milieu B (pyoverdine) : Protéose peptone n° 3 (Difco), 2 g ; Bacto-agar, 1,5 g ; glycérol, 1 g ; K_2HPO_4 (anhydre), 0,15 g ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,15 g ; eau, q. s. p. 100 ml. Ajuster (avec KOH) à pH 7,2 et filtrer sur papier. Pour ces deux milieux, il est capital d'utiliser une gélose soigneusement lavée.

Ces deux milieux sont répartis par 5 ml, stérilisés à l'autoclave (vingt minutes à 115° C) et laissés à se solidifier comme une gélose inclinée. Ils sont ensemencés en surface par strie centrale avec une anse de culture en bouillon. Les tubes, fermés seulement au coton, sont placés ensuite vingt-quatre heures à 30° C, puis à la température ambiante. La pigmentation apparaît en vingt-quatre-quarante-huit heures : le milieu A devient bleu plus ou moins foncé, la pigmentation pouvant tirer sur le violet ou le marron ; le milieu B devient vert clair avec une fluorescence très nette qu'on doit rechercher en lumière de Wood, en comparant avec le même milieu non ensemencé. Les tubes doivent être conservés au moins dix jours avant que l'on puisse considérer le résultat comme négatif.

D'autres milieux ont été proposés, capables d'accroître la production de pyocyanine, parmi lesquels nous avons retenu le milieu de Sabouraud-maltose-gélose proposé par Martineau et Forget [54] et la classique pomme de terre glycinée. Celle-ci se prépare en laissant tremper pendant la nuit des demi-cylindres de pommes de terre dans de l'eau glycinée à 4 p. 100 ; puis les fragments sont introduits dans des tubes à étranglement contenant dans leur partie basse de l'eau glycinée à 4 p. 100. Le milieu est autoclavé trente minutes à 115° C. Sur la pomme de terre glycinée, ense-

mencée en strie à partir d'une gélose, la culture de *Ps. aeruginosa* forme un enduit épais, lisse, jaunâtre ou rosé en vingt-quatre heures, puis devenant marron plus ou moins foncé par la suite ; la pomme de terre elle-même se colore et devient verdâtre ou rougeâtre plus ou moins foncé ; dans le liquide glycériné, la culture produit quelquefois une pigmentation brunâtre, mais le plus souvent, c'est une coloration bleu-vert qui apparaît, surtout en surface. Après agitation vigoureuse, l'eau glycérinée se pigmente souvent en vert intense et la pyocyanine est alors facilement mise en évidence avec du chloroforme.

Ps. fluorescens, par contre, ne produit en culture que le seul pigment fluorescent, qui a exactement les mêmes propriétés que celui élaboré par *Ps. aeruginosa*. Le milieu A de King reste rigoureusement non pigmenté, tandis que le milieu B présente la coloration verte fluorescente caractéristique, qu'on devra rechercher aussi en lumière de Wood dans le cas de pigmentation peu intense. Sur la pomme de terre glycérinée, la culture se pigmente aussi en jaune-marron, mais le pigment ne diffuse pas en dehors de la culture, et ce n'est que très rarement que l'eau glycérinée prend une teinte verte fluorescente.

Nous utilisons couramment, pour les examens de routine, les milieux A et B de King pour toutes les souches susceptibles d'être des *Pseudomonas*. Dans certains cas, particulièrement lorsque la pigmentation tarde à venir sur le milieu A, nous utilisons aussi la pomme de terre glycérinée. Les résultats obtenus avec 128 souches sont donnés dans le tableau I.

Il est frappant de constater que, sur 76 *Ps. aeruginosa* isolés récemment, seulement 4 souches ne donnaient pas de pyocyanine sur le milieu A de King. Sur ces 4 souches, l'une donnait de la pyocyanine dans l'eau glycérinée du milieu pomme de terre ; une deuxième ne donnait de pigment sur aucun milieu, mais présentait tous les autres caractères du bacille pyocyanique et appartenait au sérotype 0:2 ; les 2 autres souches, apyocyanogènes sur tous les milieux, élaboraient un pigment vert fluorescent intense sur milieu B de King et appartenaient au sérotype 0:11. Enfin 2 souches (sérotypes 0:6 et 0:11) donnaient de la pyocyanine sur milieu A de King, mais pas sur pomme de terre glycérinée.

Les 19 souches de *Ps. fluorescens* étudiées étaient toutes pigmentées sur milieu B de King, alors qu'une seule donnait des traces de pyoverdine dans l'eau glycérinée du milieu pomme de terre. Aucune ne pigmentait sur le milieu A de King.

Sur les 33 souches de collection de *Ps. aeruginosa* reçues de différents laboratoires comme sérotypes de référence, 5 ne donnaient pas de pyocyanine ; parmi ces souches, l'une est totale-

ment apigmentée, mais les 4 autres sont fortement fluorescentes sur le milieu B de King ; ces souches appartiennent aux sérotypes 0:7, 0:9 et 0:11.

Ces résultats confirment la valeur des milieux proposés par King et coll. [35]. Il reste cependant un nombre non négligeable

TABLEAU I. — Pigmentation de 109 souches de *Ps. aeruginosa* et de 19 souches de *Ps. fluorescens*.

SOUCHES	Nbre DE SOUCHES	MILIEU A DE KING*		MILIEU B DE KING*		POMME DE TERRE GLYCÉRINÉE	
		Présence de pyocyanine	Pas de pigment	Présence de pyoverdine	Pas de pigment	Présence de pyocyanine	Pas de pigment
<i>Ps. aeruginosa</i> (isolements réc.)	49	49	—	49	—	NE**	NE**
<i>Ps. fluorescens</i> (isolements réc.)	27	23	4	26	1	22	5
<i>Ps. aeruginosa</i> (sérotypes de col.)	19	—	19	19	—	—	19***
<i>Ps. aeruginosa</i> (sérotypes de col.)	33	28	5	32	1	26	7

* Milieux A et B décrits par King, Ward et Raney (1954).
 ** NE : non éprouvé.
 *** Une seule souche (60 BA) a donné en 3 jours très peu de pyoverdine dans l'eau glycinée.

de souches non pigmentées, tant chez *Ps. aeruginosa* que chez *Ps. fluorescens*, car de nombreuses souches apigmentées, classées comme *Pseudomonas*, sans autre spécification, sont vraisemblablement très proches ou identiques à *Ps. fluorescens*. Ce problème est envisagé dans le rapport suivant (Buttiaux [8]).

MÉTABOLISME RESPIRATOIRE.

Les *Pseudomonas* sont des bactéries aérobies strictes, mais ce caractère, pourtant l'un des plus anciennement étudiés en bactériologie, ne semble pas être interprété avec une égale signification par les bactériologistes tant français qu'étrangers. Aussi décrivons-nous brièvement la technique que nous avons suivie, et qui est celle habituellement utilisée à l'Institut Pasteur.

Les milieux utilisés, appelés d'un terme général « géloses profondes », sont au nombre de trois : gélose profonde de Veillon, gélose-gélatine de Legroux et gélose VF de Prévot ; leurs modes de préparation figurent dans le traité de Dumas [15].

Les deux premiers milieux contiennent, dans leur formule ori-

ginale, 0,05 p. 100 de NO_3K . Mais ce corps peut servir, en anaérobiose, d'accepteur d'hydrogène et permettre ainsi la croissance en profondeur de bactéries aérobies strictes : c'est d'ailleurs le cas pour *Ps. aeruginosa* qui, en gélose profonde-nitrate, pousse dans la zone d'anaérobiose en réduisant les nitrates en azote gazeux. Aussi, doit-on supprimer des milieux servant à éprouver les possibilités de culture d'une bactérie en présence de l'oxygène atmosphérique, tout corps capable de céder son oxygène sous l'action des enzymes bactériennes dans le milieu, comme aussi tout corps susceptible d'abaisser spécifiquement le potentiel d'oxydo-réduction du milieu (Mc Bee, Lamanna et Weeks [5]).

Nous utilisons donc des milieux sans nitrate : en pratique, soit la gélose-gélatine sans nitrate, soit la gélose VF (glucosée à 2 p. 100).

La formule de la gélose-gélatine sans nitrate est la suivante : macération de viande (500 g de viande par litre), 1 000 ml ; gélatine, 35 g ; gélose, 6 g ; peptone tryptique de caséine, 10 g ; KCl, 5 g. Ajuster à pH 7,6. Laisser refroidir à 50° C et ajouter 50 ml de sérum. Précipiter à 115°, filtrer et ajouter : glucose, 10 g. Répartir 15 ml en tubes de 170 × 17 mm et stériliser à 110° C.

Pour utiliser ces géloses profondes, on les régénère dans un bain-marie bouillant pendant 15 à 20 min, puis on les refroidit à 45-50° C, et on les ensemence dans la masse, avec une pipette Pasteur fermée et trempée dans le bouillon de culture, en utilisant le nombre de tubes nécessaires pour obtenir par dilution des colonies isolées. Après ensemencement, les tubes sont aussitôt refroidis dans l'eau, puis placés à l'étuve à 30° C.

Dans ces conditions, toutes les souches de *Pseudomonas* que nous avons examinées sont aérobies strictes, c'est-à-dire qu'elles ne cultivent qu'à la surface du milieu, et dans les 3 ou 4 mm de hauteur situés juste sous cette surface.

L'affinité des *Pseudomonas* pour l'oxygène se traduit en outre par un équipement important d'enzymes capables d'utiliser l'oxygène directement. Si, parmi ces enzymes, la catalase et la peroxydase sont des enzymes assez habituelles chez les bactéries Gram-négatives, il en est une, au contraire, qui joue un rôle fondamental en taxinomie, c'est la cytochrome-oxydase.

La cytochrome-oxydase est une enzyme ferroporphyrinique très largement répandue dans la nature, présente vraisemblablement dans toute cellule où fonctionne le système respiratoire des cytochromes. Dans ce système, la cytochrome-oxydase est la dernière enzyme de la chaîne, capable d'oxyder le cytochrome c réduit, en se transformant elle-même en enzyme réduite ; la cytochrome-oxydase réduite est alors oxydée directement au contact de l'oxygène moléculaire, elle reprend ainsi sa forme active.

Depuis très longtemps, la cytochrome-oxydase était mise en évidence dans les cellules grâce à la réaction de Nadi dont le principe est le suivant : en présence de cytochrome *c*, de cytochrome-oxydase, d'oxygène moléculaire, et dans un milieu tampon phosphate (pH : 7,8), le mélange équimoléculaire d' α -naphtol et de chlorhydrate de diméthyl-paraphénylènediamine donne une coloration bleue intense due à la formation d'un complexe, le bleu d'indophénol. Le plus souvent, le cytochrome *c* est supposé présent en quantité suffisante dans la cellule où l'on recherche la cytochrome-oxydase. Ne donnent une réaction colorée que les bactéries ayant un système cytochrome dont le potentiel de redox est supérieur au potentiel de redox du bleu d'indophénol formé.

Cette technique fut appliquée à la bactériologie par Gaby et Hadley [22], qui utilisent comme réactifs un mélange d' α -naphtol et d'oxalate de para-amino-diméthyl-aniline, ajouté soit dans la culture en bouillon, soit sur les colonies d'une gélose.

Si, dans les mêmes conditions opératoires que ci-dessus, l'on omet l'addition d' α -naphtol, on a alors une réaction un peu différente : il se forme dans ce cas une semi-quinone rouge, instable, qui, après quelques instants, s'oxyde en un dérivé noirâtre. Conventionnellement, l'enzyme bactérienne responsable de cette réaction est désignée d'un terme vague « oxydase », bien que, probablement, il s'agisse aussi de la cytochrome-oxydase ; d'ailleurs, si, comme le fait Buttiaux [8], on ajoute de l' α -naphtol après avoir obtenu la coloration rouge, celle-ci vire rapidement à un bleu identique au bleu d'indophénol.

Cette technique de recherche de « l'oxydase » est utilisée en bactériologie depuis le travail de Gordon et MacLeod [27] qui se servaient de solutions de chlorhydrate de diméthyl ou de tétraméthyl-paraphénylène-diamine versées directement sur les colonies bactériennes ; les colonies oxydase-positives devenaient rouges, puis, en une à deux minutes, noires. Kovacs [45] utilisa la tétraméthyl-paraphénylène-diamine, mais avec une technique un peu différente : une goutte du réactif est versée sur un papier-filtre, et sur cette tache humide, la colonie éprouvée, prélevée à l'anse de platine, est ensuite étalée sur une petite surface.

Actuellement, on est donc en présence de plusieurs méthodes. Signalons cependant que la tétraméthyl-paraphénylène-diamine est à proscrire, car outre son prix élevé, c'est un corps beaucoup moins stable que le dérivé diméthylé, et qui est capable de donner de fausses réactions positives, comme l'a signalé Klinge [41].

On utilise donc actuellement un seul réactif : la diméthyl-paraphénylène-diamine (synonyme : para-amino-diméthyl-aniline), sous forme de chlorhydrate, ou mieux d'oxalate, en solutions aqueuses à 1 p. 100. Ces solutions se conservent quelques jours à la glacière

dans le cas de l'oxalate, mais doivent se préparer extemporanément dans le cas du chlorhydrate. Pour faire une réaction de Nadi, on peut ajouter à l'une des solutions précédentes le même volume d'une solution à 1 p. 100 d' α -naphтол dans l'alcool à 95 p. 100. Cette solution se conserve aussi quelques jours à la glacière.

Il y a trois méthodes possibles de recherche : en milieu liquide (technique de Gaby et Hadley : 4,5 ml de bouillon + 0,2 ml d' α -naphтол + 0,3 ml d'oxalate de para-amino-diméthyl-aniline), sur gélose (addition sur les colonies de quelques gouttes de réactifs), ou sur papier, selon la technique de Kovacs.

Personnellement, nous utilisons indifféremment les deux sels du réactif, avec ou sans addition d' α -naphтол. Plutôt que la méthode en milieu liquide, dont les résultats sont parfois difficiles à interpréter avec certains germes donnant une réaction tardive, ou à cause de fausses réactions dues au bouillon, nous utilisons les cultures sur gélose, en recherchant la cytochrome-oxydase directement sur les colonies, ou par l'intermédiaire du papier-filtre.

Ces techniques sont équivalentes dans le cas de *Ps. aeruginosa* et de *Ps. fluorescens*. Les résultats sont absolument constants : toutes nos souches examinées (52 *Ps. aeruginosa* et 16 *Ps. fluorescens*) donnent une réaction de cytochrome-oxydase positive, la coloration rouge ou bleue apparaissant en moins d'une minute (et en deux à trois minutes en milieu liquide).

MÉTABOLISME GLUCIDIQUE.

Les réactions énergétiques conditionnant la vie de la cellule sont régies par certains métabolismes-clefs, parmi lesquels celui du glucose joue un rôle primordial. Le mécanisme suivant lequel le glucose est catabolisé, constitue une caractéristique fondamentale et inaliénable de la cellule, liée aux processus de respiration, et la découverte assez récente de nouvelles voies métaboliques, particulièrement chez les bactéries, a ouvert à la taxinomie des possibilités nouvelles (Clarke [14]).

Trois voies principales ont été décrites chez les bactéries (fig. 1). En plus de la voie glycolytique classique, passant par le stade hexose-diphosphate, voie pouvant fonctionner en anaérobiose, deux autres voies ont été individualisées qui ne peuvent fonctionner qu'en aérobiose : le shunt oxydatif ou voie du monophosphate, et une voie oxydative directe, sans phosphorylation, passant par le gluconate.

L'exploitation de ces connaissances en bactériologie a pu être réalisée grâce à l'emploi de méthodes simples. Nous ne ferons que citer le travail de Barron et Friedemann [4] montrant que l'utilisation du glucose par *Ps. aeruginosa* n'est pas inhibée en présence de fluorure, ce corps étant inhibiteur de la voie glycolytique.

Mais une autre méthode, très simple et pratique, due à Hugh et Leifson [32], doit être bien connue, car elle est maintenant très largement employée.

Ces auteurs utilisent le milieu suivant : peptone pancréatique de caséine, 2 g ; NaCl, 5 g ; K_2HPO_4 , 0,3 g ; gélose, 3 g ; bleu de bromothymol, 0,03 g ; eau distillée, q. s. p. 1 000 ml. Ajuster le pH à 7,1. Filtrer. Répartir par 10 ml en tubes 17 x 170 ou par 3 ml en tubes 12 x 120. Boucher au coton. Autoclaver à 115° C. Pour l'utilisation, faire fondre au bain-marie à 100° C (la régénération par ébullition est inutile), ramener à 50° C et

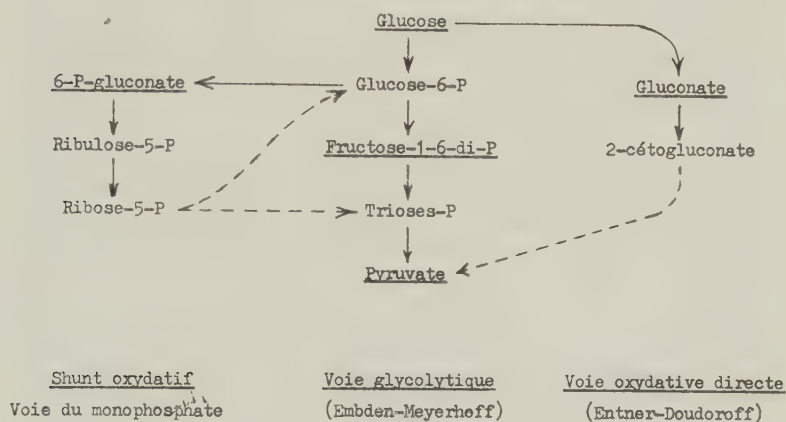


FIG. 1. — Schéma simplifié du métabolisme du glucose.

ajouter le glucide à étudier (q. s. p. 1 p. 100). Faire solidifier en culot dans l'eau froide.

Pour étudier le métabolisme oxydatif ou fermentatif du glucose, Hugh et Leifson ont proposé d'utiliser pour chaque souche deux tubes de leur milieu, glucosé à 1 p. 100 ; ces tubes sontensemencés par piqûre centrale avec le fil de platine trempé dans une culture de 24-48 heures en bouillon. L'un des tubes ensemencés est ensuite recouvert d'une couche de vaseline fondue (au bain-marie) sur une hauteur de 6 à 12 mm, et aussitôt plongé dans l'eau froide pour refroidir la vaseline.

Avec ces deux tubes, on peut distinguer trois catégories de germes :

a) Les germes fermentatifs qui donnent une réaction acide dans les deux tubes, avec ou sans production de gaz. Il est impossible, dans ce cas, de déceler le métabolisme oxydatif, la fermentation

s'accompagnant d'un virage intense dans la totalité des deux tubes.

b) Les germes oxydatifs qui donnent une réaction acide seulement dans le tube « ouvert ». Très souvent, la culture provoque une légère alcalinisation transitoire en surface, puis la réaction acide apparaît à la surface du tube et s'étend graduellement vers le bas. Par contre, dans le tube « fermé », c'est-à-dire recouvert de vaseline, le pH ne change pas et la culture est faible, souvent limitée à un disque situé sous la vaseline. Ces bactéries oxydatives, souvent aérobies strictes en gélose profonde, sont donc incapables d'utiliser les glucides pour leur croissance en anaérobiose même relative.

c) Les germes non-oxydants et non-fermentants, encore appelés inactifs, qui ne modifient pas le pH dans aucun des deux tubes, ou bien donnent seulement une alcalinisation du tube « ouvert » dans le cas de variétés alcalinisantes.

Hugh et Leifson [32] ont montré que les germes qui oxydent le glucose sans le fermenter sont incapables, très probablement, de fermenter un autre sucre, si bien qu'il suffit d'étudier le métabolisme des autres sucres seulement dans des tubes « ouverts ».

Différents auteurs se sont attachés à identifier les voies oxydatives utilisées par les *Pseudomonas*. C'est ainsi, par exemple, qu'a été étudiée la voie oxydative directe passant par le gluconate et le 2-cétogluconate chez *Ps. aeruginosa* (Stokes et Campbell [71]) et chez *Ps. saccharophila* (Entner et Doudoroff [48]) ; plus récemment, Katznelson [34] montra que l'oxydation du 2-cétogluconate par les *Pseudomonas* aboutissait également au pyruvate.

Des expériences ont été tentées pour distinguer ces deux voies oxydatives chez les *Pseudomonas*. Citons les travaux de Eagon [46] qui put individualiser dans des extraits acellulaires de *Ps. fluorescens*, une fraction qui seule conservait la propriété d'oxyder le glucose 6-P, alors qu'une deuxième fraction ne contenait plus que les enzymes de la voie directe du 2-cétogluconate. Dans un travail récent, Stern, Wang et Gilmour [70] sont parvenus à chiffrer le pourcentage d'utilisation du glucose par chacune des voies primaires de son catabolisme : pour les trois souches étudiées appartenant au genre *Pseudomonas*, les chiffres obtenus pour la voie glycolytique d'Emden Meyerhoff, la voie d'Entner-Doudoroff et le shunt oxydatif sont, dans l'ordre : *Ps. saccharophila*, 0 p. 100, 100 p. 100 et 0 p. 100 ; *Ps. reptilovora*, 0 p. 100, 72 p. 100 et 28 p. 100 ; *Ps. aeruginosa*, 0 p. 100, 71 p. 100 et 29 p. 100. On voit l'importance pour la taxinomie de ces considérations, faisant appel à l'étude de systèmes enzymatiques constitutifs de la cellule bactérienne.

Malheureusement, ces études sont très complexes, et le bacté-

riologiste n'a guère à sa disposition que le test d'oxydation du gluconate en 2-cétogluconate, en culture agitée, selon la technique proposée par Haynes [30]. L'utilisation de cette méthode est discutée ailleurs (Buttiaux [8]).

S'il est classique de dire que, chez la majorité des bactéries, l'utilisation des glucides se fait par l'intermédiaire du glucose, il semble exister, chez les *Pseudomonas*, des déshydrogénases spécifiques capables d'oxyder les aldoses, notamment le glucose, le lactose et le maltose (Bentley et Slechta, [6]), en acides aldobioniques correspondants. La formation d'acide lactobionique sur gélose lactosée à 10 p. 100 a d'ailleurs été signalée par Buttiaux et Gagnon [7].

Quoi qu'il en soit, les acides provenant de l'attaque des différents glucides oxydés par les *Pseudomonas* sont toujours élaborés en quantités faibles et peuvent être masqués par les produits basiques du catabolisme protéique dans un milieu trop riche en protéines, tel que l'eau peptonée à 1 p. 100 habituelle, où de très nombreuses souches de *Pseudomonas*, y compris *Ps. aeruginosa*, ne produisent aucune acidité visible. Il convient donc d'utiliser un milieu relativement pauvre en protéines et assez peu tamponné.

Le milieu décrit par Hugh et Leifson [32], dont la formule est donnée plus haut, convient bien pour cette étude. Liu [50] avait utilisé, de son côté, une eau peptonée à 0,1 p. 100 et Simon [67], une dilution à 5 p. 100 de macération de viande dans l'eau. Mais nous avons montré (Véron et Chatelain [76]) qu'un milieu gélosé, dérivé de celui proposé par Simon, donnait des résultats positifs plus précoces et plus nombreux que tous ces différents milieux. La formule du milieu macération-gélose que nous utilisons est la suivante :

Macération de viande (500 g de viande de bœuf par litre), 50 ml ; KCl, 5 g ; gélose, 3 g ; rouge de phénol, 0,02 g ; eau distillée, q. s. p. 1 000 ml. Ajuster le pH à 7,4. Filtrer. Répartir par 10 ml en tubes 17 × 170 ou par 3 ml en tubes 12 × 120. Boucher au coton. Autoclaver à 115° C. Ce milieu s'utilise de la même façon que le milieu de Hugh et Leifson cité plus haut ; il est parfois nécessaire de réajuster le pII à 7,4 (avec une solution 0,1 N de potasse) avant d'ensemencer, notamment lorsqu'on utilise certains glucides dont les solutions sont acides.

Dans ce milieu macération-gélose, 109 souches de *Ps. aeruginosa* ou *Ps. fluorescens* se sont toutes montrées oxydatives, sauf une souche de collection de *Ps. aeruginosa* qui était inactive sur les glucides. Sur 69 souches de *Ps. aeruginosa* isolées récemment, le résultat était acquis en vingt-quatre heures pour 60 souches, en trois jours pour 66 souches et en quatre jours

pour 68 souches. Une seule souche (60 CN), très muqueuse, n'a oxydé le glucose qu'en trois semaines. Avec 19 souches de *Ps. fluorescens*, l'oxydation du glucose était manifeste après un jour ou moins (14 souches), deux jours (4 souches) et sept jours (1 souche).

Un autre caractère est à rapprocher du métabolisme du glucose : c'est l'utilisation du citrate comme seule source de carbone dans un milieu synthétique minéral avec un sel d'ammonium comme source d'azote. Nous l'avons recherchée systématiquement sur milieu au citrate de Simmons, en utilisant comme indicateur du bleu de bromothymol en solution sodique, et non alcoolique, puisque les *Pseudomonas* sont capables d'utiliser l'alcool comme source de carbone. Dans ces conditions, toutes nos souches de *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* utilisent le citrate et cultivent sur le milieu en l'alcalinisant, en vingt-quatre heures le plus souvent, et rarement en quarante-huit heures. Le caractère citrate + semble être indispensable pour le diagnostic de ces bactéries, comme l'a souligné Rhodes [61].

L'étude systématique de l'oxydation des glucides par les *Pseudomonas*, dans le milieu macération-gélose, a été publiée par ailleurs (Véron et Chatelain [76]) ; elle apporte, en général, des résultats n'intéressant que les espèces et non le genre *Pseudomonas* dans son ensemble.

POUVOIR PROTÉOLYTIQUE ET LÉCITHINASE.

Les réactions concernant la protéolyse et la lécithinase sont recherchées, pour la plupart, par les moyens classiques utilisés en bactériologie.

A 30° C, on recherchera : la peptonisation du lait tournesolé, l'hémolyse des hématies de mouton ou de cheval sur une gélose au sang à 5 p. 100, la réduction des nitrates en bouillon-nitrate (0,1 p. 100 de NO_3K), la production de H_2S en gélose nutritive molle au sous-acétate de plomb, ensemencée par piqûre, la production de NH_3 en bouillon nutritif, la production d'indole dans une culture de 16-24 heures en eau peptonée ; à 20-22° C, on recherchera la liquéfaction de la gélatine nutritive ensemencée par piqûre centrale.

L'hydrolyse de l'urée doit se rechercher à 30° C sur gélose-peptone-glucose-urée de Christensen [43], ou en milieu synthétique-urée contenant, en plus, selon les indications de Rhodes [61], 0,1 p. 100 de glucose ; le milieu que nous avons utilisé est le suivant : K_2HPO_4 (450 mg), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (75 mg), KCL (50 mg), $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg), urée (2 g), glucose (100 mg), eau distillée (q. s. p. 100 ml). Ce milieu stérilisé par filtration, est ensemencé largement à partir d'une culture sur gélose, et incubé à 30° C.

La recherche d'une lysine-décarboxylase dans une culture de 48 heures à 30° C sur milieu glucose-lactose-SH₂ est réalisée par la technique classique utilisée pour les Entérobactéries et décrite par Thibault et Le Minor [72]. L'hydrolyse de l'arginine est recherchée selon la méthode originale de Sherris et Shoesmith [64]; pour les détails techniques, on pourra se reporter au rapport suivant (Buttiaux [8]). Un dernier caractère a été proposé pour différencier les *Pseudomonas* (Klinge et Gräf [40], Rhodes [61]); il s'agit de la réaction au jaune d'œuf, qui peut être recherchée sur gélose au jaune d'œuf, selon la technique décrite par Knight et Proom [42] pour l'étude des *Bacillus*.

Le pouvoir hémolytique des *Pseudomonas* est très variable d'une espèce à l'autre, mais dans certaines conditions, on peut le mettre en évidence chez la majorité des souches (Liu [51]); cette étude ne peut donc servir à distinguer les espèces. De même, la réduction des nitrates, soit en nitrites, soit en azote, si elle est constante dans un bouillon-nitrate chez *Ps. aeruginosa*, et le plus souvent absente chez *Ps. fluorescens*, survient avec toutes les souches de *Pseudomonas* si on modifie les conditions d'étude (Klinge [38]). Signalons aussi que, s'il est classique de dire que *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* ne donnent pas de H₂S, on a pu trouver cependant des souches de *Ps. aeruginosa* qui en donnent un peu, tardivement, dans certaines conditions (Rhodes [61]; Klinge [38]); mais ce caractère semble de peu de valeur pour l'étude des espèces.

L'étude de l'uréase des *Pseudomonas* nécessite quelques remarques. En effet, cette enzyme inductible n'est pas révélée dans le milieu urée-tryptophane utilisé pour les Entérobactéries, milieu qui devient seulement un peu alcalin en six-huit jours; d'où la description de *Pseudomonas* uréase-négatifs (Lutz et coll. [52]; Klinge [38]). Mais sur 20 *Ps. aeruginosa* et 10 *Ps. fluorescens* examinés, 29 souches donnaient une franche alcalinisation en vingt-quatre à quarante-huit heures du milieu à l'urée de Christensen, tandis que le tube témoin sans urée restait neutre pendant huit jours et plus; une seule souche de *Ps. fluorescens* se montra uréase-négative. En milieu synthétique-urée-glucose, les proportions de souches uréase-positives après un à cinq jours d'observation sont beaucoup plus faibles: 14 *Ps. aeruginosa* sur 20, et seulement 2 *Ps. fluorescens* sur 10. Le nombre de souches positives dans les mêmes conditions tombe à 4 si on supprime le glucose, ou si on le remplace par la même quantité de galactose. En définitive, si l'uréase de *Ps. aeruginosa* semble plus active que celle de *Ps. fluorescens*, cette étude ne peut guère servir à distinguer les deux espèces.

Nous avons recherché la présence d'une lysine-décarboxylase dans des cultures de 48 heures de 23 souches de *Ps. aeruginosa*

et 12 souches de *Ps. fluorescens* ; cette recherche a été constamment négative.

Enfin, sur milieu au jaune d'œuf, on a obtenu les résultats suivants : réaction positive avec *Ps. fluorescens*, var. protéolytique (7 souches), réaction négative avec *Ps. fluorescens*, var. non protéolytique (11 souches), réaction restreinte avec *Ps. fluorescens* (3 souches peu protéolytiques, liquéfiant soit le sérum coagulé, soit la gélatine) et *Ps. aeruginosa* (6 souches).

En définitive, les renseignements fournis par toutes ces méthodes peuvent se répartir en deux groupes. Le premier groupe correspond à des caractères variables chez les *Pseudomonas* : hydrolyse de la gélatine, peptonisation du lait, hémolyse, réduction des nitrates, production de H_2S , hydrolyse de l'urée, réaction au jaune d'œuf. Le deuxième groupe d'épreuves donne des résultats constants chez les *Pseudomonas* pigmentés : recherche de l'indole et de la lysine-décarboxylase négative, recherche de NH_3 positive, et catabolisme de l'arginine positif.

AUTRES CARACTÈRES.

Le pouvoir pathogène naturel des *Pseudomonas* est très variable, puisqu'il peut concerner l'homme, les animaux à sang chaud et à sang froid et les plantes. Expérimentalement, parmi les *Pseudomonas* pigmentés, seul *Ps. aeruginosa* est pathogène pour le cobaye et le lapin, d'ailleurs à des doses très variables selon les souches. Ce caractère est important pour le diagnostic d'espèce, car *Ps. fluorescens* n'est absolument pas pathogène dans les mêmes conditions. Il faut noter aussi que la description des souches phytopathogènes est parfois très succincte et que le caractère principal d'identification de ces souches consiste à reconnaître l'hôte végétal sensible.

La sensibilité aux bactériophages de *Ps. aeruginosa* a donné lieu à un certain nombre de travaux d'où il ressort que la majorité des souches est lysogène, et que les phages actifs sur *Ps. aeruginosa* sont inactifs sur *Ps. fluorescens* ; d'autre part, de nombreuses souches de *Ps. aeruginosa* sont pyocinogènes et les pyocines, actives sur *Ps. aeruginosa*, sont également nombreuses. Chez *Ps. fluorescens*, l'étude des bactériophages a été entreprise (Klinge [39]) ; ces bactériophages sont spécifiques du groupe *fluorescens-putida* et inactifs sur *Ps. aeruginosa*. Hamon [29] a montré, d'autre part, que très peu de souches de *Ps. fluorescens* sont lysogènes, mais que environ 20 p. 100 des souches élaboraient des bactériocines (fluorescines), dont quelques-unes seulement étaient actives sur *Ps. aeruginosa* ; inversement, certaines souches de *Ps. fluorescens* sont sensibles à quelques pyocines élaborées par *Ps. aeruginosa*. Donc, si la spécificité des bactério-

phages paraît étroite, celle des bactériocines l'est relativement moins. Ceci pourrait avoir des conséquences importantes en taxinomie.

Si l'étude antigénique de *Ps. fluorescens* ne semble pas avoir été tentée, par contre, celle de *Ps. aeruginosa* a donné lieu à de nombreux travaux parmi lesquels nous citerons ceux de Habs [28], de Köhler [43], de Kleinmaier [36] et de Sandvik [62].

En utilisant la technique de Kleinmaier et la description des groupes antigéniques O de Habs, nous avons établi le sérotype de 106 souches de *Ps. aeruginosa*, sur 118 souches examinées (tableau II).

Le détail de ce travail doit paraître ailleurs (Véron [77]) ; mais on peut noter dès maintenant que seulement 12 souches sur 118

TABLEAU II. — Typage antigénique de 118 souches de *Ps. aeruginosa*.

GROUPES ANTIGÉNIQUES O	NOMBRE DE SOUCHES
1	16
2	3
2/5	17
3	5
4	5
5	10
6	25
7/8	7
9	3
10	4
11	11
12	
TOTAL	106
NON GROUPEABLES ..	12

(soit environ 10 p. 100) n'ont pu être agglutinées avec certitude. Ce chiffre est du même ordre que celui trouvé par d'autres auteurs (Kleinmaier et Quincke [37]), et on possède certainement, avec le typage antigénique, un moyen essentiel pour affirmer le diagnostic de la plupart des souches de *Ps. aeruginosa*, d'autant qu'on ne trouve pas de réactions croisées avec *Ps. fluorescens*.

DISCUSSION

Le genre *Pseudomonas*, dont l'espèce-type est *Ps. aeruginosa*, se situe dans une perspective toute différente, dans la classification de Prévot [59] et Brisou [40], et dans la classification selon Bérgey (Breed, Murray et Smith [9]).

Pour Prévot, les *Pseudomonas* sont des bâtonnets mobiles par

cils polaires, Gram-négatifs, vivant dans le sol et l'eau, parasites des plantes ou saprophytes ou libres, produisant un pigment bleu ou vert jaune soluble dans l'eau et diffusant dans le milieu. Les *Pseudomonas* sont inclus dans la tribu des *Pseudomonadeae* avec des genres pérित्रiches ou céphalotriches, colorés ou non, et un genre fermentant et pérित्रiche (*Erwinia*). Cette tribu forme avec les tribus des *Achromobactereae* et des *Chromobactereae* la famille des *Pseudomonadaceae*.

Pour Bergey, les *Pseudomonas* sont des bactéries oxydantes, pigmentées (pigment soluble ou insoluble) ou apigmentées, appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* qui comprend les bactéries de forme bacillaire ou coccoïde, mobiles (cils polaires) ou immobiles, Gram-négatives, aérobies préférentielles, parfois fermentantes (cas du genre *Aeromonas*).

On voit que les bases taxinomiques des deux classifications sont différentes, en particulier en ce qui concerne l'importance accordée à la ciliature. La différence essentielle entre les deux définitions du genre *Pseudomonas* est que la pigmentation constitue un caractère absolu pour Prévot, tandis qu'elle n'est pas obligatoire pour Bergey. De plus, Bergey introduit la notion de métabolisme oxydatif pour les *Pseudomonas*.

Ayant passé en revue les principaux caractères qui ont été étudiés chez les *Pseudomonas*, nous pouvons en définir un certain nombre qui sont constants dans les espèces pigmentées que nous avons envisagées jusqu'ici.

La mobilité et la ciliature exclusivement polaire des *Pseudomonas* ne sont mises en doute par personne et ces caractères doivent dominer toute tentative de classification. Il est cependant impossible d'écarter, *a priori*, les souches immobiles, cette immobilité pouvant être liée à une perte héréditaire de la ciliature ; il est vraisemblable qu'il doit exister des souches de *Pseudomonas* dépourvues d'antigène H, comme cela existe dans les autres groupes bactériens ; ce type de bactérie doit être d'ailleurs fort rare.

L'aérobiose stricte, l'existence d'une réaction de cytochrome-oxydase positive, le métabolisme oxydatif du glucose, l'utilisation du citrate en milieu synthétique-ammonium, sont des caractères présents chez toutes les souches de *Pseudomonas* examinées. Ce sont des témoins de mécanismes physiologiques fondamentaux chez ces bactéries et ils ne devraient jamais faire défaut. Il faut toutefois insister sur quelques particularités concernant ces réactions.

Nous avons dit plus haut la nécessité de rechercher l'utilisation de l'oxygène pour la croissance dans une gélose profonde dépourvue de nitrate : sans cette précaution, la plupart des souches de

Ps. aeruginosa, ainsi que, par exemple, de *Ps. stutzeri* comme l'ont montré Van Niel et Allen [53], sont capables de cultiver en profondeur en réduisant les nitrates en azote gazeux.

La réaction des oxydases doit être réalisée également dans des conditions convenables. Certains auteurs ne se sont pas placés, semble-t-il, dans les meilleures conditions opératoires. C'est ainsi que Kovacs [45], utilisant un sel de tétraméthyl-paraphénylène-diamine, et Köhler [44], utilisant de l'oxalate *p*-amino-diméthylaniline synthétisé dans son Institut de Recherches, ont cru pouvoir affirmer que la réaction était positive avec *Ps. aeruginosa* et négative avec *Ps. fluorescens*. Gaby et Free [23], de leur côté, ont rejeté la technique de Kovacs, car elle donnait de « fausses » réactions positives avec des bactéries autres que les *Pseudomonas*. Actuellement, en opérant dans de bonnes conditions, on a pu constater que la réaction de cytochrome-oxydase était positive chez un nombre important d'espèces microbiennes, et Ewing et Johnson [49] ont ainsi séparé en deux groupes bien distincts les bacilles Gram-négatifs oxydase — (Entérobactéries, *Serratia*) et oxydase + (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*). Kleinmaier et Quincke [37] ont montré que la recherche systématique de la cytochrome-oxydase permettait d'accroître sensiblement le nombre de souches de *Pseudomonas* dépistées dans un laboratoire de diagnostic bactériologique.

Enfin, il est trop tôt encore, semble-t-il, pour utiliser à des fins taxinomiques la connaissance que nous avons des voies empruntées dans l'oxydation du glucose. L'épreuve proposée par Hugh et Leifson [32] est fondamentale pour distinguer les bactéries oxydantes et fermentantes ; mais le test d'oxydation du gluconate, considéré par Haynes [30] comme caractéristique de *Ps. aeruginosa*, est positif aussi avec *Ps. fluorescens* (Rhodes [61]) et également avec des bactéries autres que les *Pseudomonas* (Gaby [21] ; Moore et Pickett [55]). D'autre part, l'absence de 2-cétogluconate dans le milieu ne prouve pas que le gluconate n'a pas été oxydé, puisque, dans certaines conditions, l'oxydation peut aller jusqu'au pyruvate (Katznelson [34]). Il est cependant probable que la voie d'oxydation directe du glucose en gluconate, ou de différents glucides en acides aldobioniques correspondants (Bentley et Slechta [6]), est plus caractéristique encore des *Pseudomonas* que la voie du shunt oxydatif passant par le glucose-6-phosphate ; on connaît d'ailleurs une espèce, *Ps. saccharophila*, qui n'utilise que la voie du gluconate (Stern et coll. [70]).

Quatre autres caractères du métabolisme protéique des *Pseudomonas* paraissent constants chez les espèces pigmentées. Ce sont l'absence de production d'indole en eau peptonée, l'absence de lysine-décarboxylase, la production de NH_3 et le catabolisme

de l'arginine. La production de NH_3 est constante et constitue un métabolisme « de base » des *Pseudomonas*, puisque des cellules au repos de *Ps. aeruginosa* produisent, dans leur respiration endogène, uniquement CO_2 et NH_3 (Warren et coll. [78]). L'utilisation de l'arginine paraît également constante avec les *Pseudomonas* pigmentés (Sherris et Schoesmith [64] ; Buttiaux [8]).

Ces caractères pourraient servir à la définition du genre *Pseudomonas* qui comprendrait ainsi les bactéries en fins bâtonnets, Gram-négatives, non sporulées, mobiles par cils polaires (ou immobiles), aérobies strictes, cytochrome-oxydase +, glucose + par voie oxydative (ou inactives sur les glucides), citrate +, NH_3 +, arginine-dihydrolase +, indole —, et lysine-décarboxylase —.

Cette définition permet d'exclure des *Pseudomonas* certaines bactéries comme *Ps. hydrophila*, bactérie fermentant les glucides avec production de gaz, rangée actuellement dans les *Aeromonas* (Stanier [69]). Une autre bactérie *Zymomonas mobilis* (anciennement *Pseudomonas mobilis*) chez qui n'existent pas les enzymes du cycle de Krebs (Stern et coll. [70]), n'est plus rangée dans le genre *Pseudomonas*. Enfin, il paraît difficile, comme dans la classification de Prévot [59], de rapprocher des *Pseudomonas* des bactéries comme les *Erwinia*, celles-ci étant périclitrices, fermentantes (Katznelson [34]), et habituellement oxydase — (Ewing et Johnson [19]).

À l'intérieur du genre *Pseudomonas*, les distinctions sont parfois malaisées. Si le groupe des bactéries marines reste justifié, car la physiologie de ces bactéries est très particulière, par contre, la séparation d'espèces phytopathogènes paraît plus arbitraire. Citons, en effet, comme exemple, le cas de *Ps. polycolor*, décrit dans le *Bergey's Manual* (Breed et coll. [9]) comme pathogène pour les plantes, et qui est distingué nettement de *Ps. aeruginosa* trouvé dans le sol, les eaux d'égouts et chez les animaux ; or, on a pu obtenir expérimentalement une maladie typique des plants de tabac avec *Ps. aeruginosa*, et des troubles pathogènes chez la souris avec *Ps. polycolor* ; les deux espèces cultivent à 42° C et convertissent le gluconate en 2-cétogluconate, et Hoff et Drake [31] ont montré que *Ps. polycolor* était sensible aux mêmes phages que certains lysotypes de *Ps. aeruginosa* ; les deux espèces sont donc très proches, sinon identiques. L'effet phytopathogène dans une espèce pourrait se perdre, d'autre part, par mutation, le mutant non phytopathogène ayant perdu la capacité de synthétiser ses enzymes pectolytiques (Friedmann et Ceponis [20]).

Un certain nombre d'espèces de *Pseudomonas* ont été décrites qui pourraient n'être que des variétés d'espèces courantes. Cela semble le cas, par exemple, pour *Ps. vendreli* qui serait une

variété de *Ps. aeruginosa* (Tobie [74]), pour *Ps. myxogenes* qui serait une variété de *Ps. fluorescens* (Klinge [38]). De nombreuses souches, appartenant à plusieurs espèces décrites, ont été examinées par Rhodes [61] qui a montré leur parenté et même leur similitude probable avec l'espèce *Ps. fluorescens* qu'elle étudiait.

En définitive, parmi les espèces produisant un pigment soluble, trois espèces sont bien décrites et ont reçu plusieurs définitions concordantes : *Ps. aeruginosa* (Gaby [21]; Lutz et coll. [52]; Moore et Pickett [55]), monotriche, cultivant à 42° C, dégageant en culture une odeur aromatique, pouvant donner de la pyocyanine et de la pyoverdine, ne donnant pas la réaction au jaune d'œuf, liquéfiant la gélatine ; *Ps. fluorescens* (Rhodes [61]; Klinge [38]), lophotriche, ne cultivant pas à 42° C, dégageant en culture une odeur désagréable, ne produisant que de la pyoverdine, donnant la réaction au jaune d'œuf, liquéfiant la gélatine ; *Ps. putida* (Klinge [38]) qui ne diffère de *Ps. fluorescens* que par l'absence de pouvoir protéolytique et par une réaction au jaune d'œuf négative. Beaucoup d'auteurs, dont Rhodes, n'admettent pas l'individualité de *Ps. putida* qui ne serait qu'une variété de *Ps. fluorescens* ; la sensibilité croisée aux bactériophages (Klinge [39]) plaide en faveur de cette hypothèse.

CONCLUSIONS.

Il est très généralement admis que la production de pigment par les bactéries est un phénomène variable ; les *Pseudomonas* n'échappent pas à la règle.

La production de pyocyanine et de pyoverdine dépend, nous l'avons vu, des milieux de culture utilisés ; la pigmentation est liée notamment au potentiel d'oxydo-réduction du milieu, et bien souvent avec *Ps. aeruginosa*, ce potentiel est suffisant pour que le pigment fluorescent soit oxydé, mais insuffisant pour que la pyocyanine apparaisse ; celle-ci ne s'oxyde et ne se colore alors qu'après forte agitation du milieu.

La pyocyanine agit dans la chaîne respiratoire comme transporteur d'électrons. Par déshydrogénation chimique, Azoulay et Senez [3] ont pu réduire la pyocyanine en un dérivé fluorescent ; d'autre part, d'après l'hypothèse de Césaire et coll. [42], le pigment fluorescent serait un précurseur dans la synthèse de la pyocyanine. On voit que les deux pigments, pyocyanine et pyoverdine, sont étroitement liés, car il faut admettre l'identité des pigments fluorescents chez *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* (Turfitt [75]). Il apparaît donc déjà difficile de refuser le diagnostic de pyocyanique à une souche qui ne serait que fluorescente, et ce type de bactérie, correspondant au groupe Ia de Seelen et Stark [66], paraît assez fréquent.

L'existence de souches apigmentées est, d'autre part, connue de longue date. La perte de production de pigment, au cours des repiquages de souches pigmentées à l'isolement, est une notion classique (Wilson et Miles [80]). Mais cette variation peut survenir encore plus rapidement. Gessard [26] a signalé lui-même que sur une culture en gélose, obtenue « par repiquage de la première gélose ensemencée avec le pus d'une articulation ouverte, où le bacille pyocyanique se trouvait presque à l'état de pureté », il y avait côte à côte des colonies de germes pyocyanogènes et des colonies complètement apigmentées. Une semblable dissociation a été décrite récemment par Klinge [38] avec une souche de *Ps. fluorescens*.

S'il est encore assez rare, actuellement, d'isoler des souches totalement apigmentées de *Ps. aeruginosa*, il est probable que cela provient plus d'un défaut d'identification que d'une rareté de ce type de bactéries. En effet, l'inhibition de la production de pigment, soit *in vivo*, notamment après traitement par la streptomycine (Andrieu et coll. [2]; Lutz et coll. [52]), soit *in vitro*, par exemple après une seule culture en présence de concentrations sub-inhibitrices de chloramphénicol et d'érythromycine (Schneider et coll. [65]), paraît être un phénomène très général, signalé de longue date avec les antiseptiques (Wasserzug [79]), qui, sans aucun doute, fera augmenter sensiblement dans l'avenir, par suite de l'utilisation intensive des antibiotiques, la fréquence des souches apigmentées de *Pseudomonas*.

Ces notions étant acquises, et dès lors qu'un caractère a été démontré aléatoire, ce caractère ne peut demeurer une condition nécessaire d'appartenance à un groupe bactérien.

Toute classification doit évoluer en même temps que l'objet classé, et en tenant compte des nouveaux caractères décrits. La difficulté vient de la nécessité, dans la taxinomie classique, de reconnaître des caractères plus importants que d'autres, et de la répugnance toute naturelle des taxinomistes à renverser ultérieurement l'ordre établi. Il est possible que la seule méthode qui mette à l'abri du choix arbitraire de la hiérarchie des caractères soit la méthode de classification d'Adansonian proposée en bactériologie par Sneath [68]; dans cette méthode, on attribue les mêmes « poids » aux caractères taxinomiques, ce qui permet de calculer un pourcentage de similitude entre les souches étudiées et de distinguer ainsi les groupes naturels existant parmi les bactéries étudiées.

Cette étude ne paraît pas avoir été entreprise pour les *Pseudomonas*; elle semble d'ailleurs surtout valable pour reconnaître les espèces. De toutes façons, le genre bactérien doit être défini par un certain nombre de caractères majeurs qui mettent en

cause la morphologie et la physiologie fondamentale de la bactérie, en excluant, par exemple, toutes les enzymes accessoires du métabolisme, qui, elles, serviront à distinguer les espèces.

Grâce aux critères choisis plus haut comme étant caractéristiques des *Pseudomonas* pigmentés, il devient ainsi possible d'identifier avec certitude des bactéries non pigmentées, mais qui ont tous les autres caractères des espèces-types, *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens*; c'est le cas des *Pseudomonas* non pigmentés qui seront décrits dans le rapport suivant (Buttiaux [8]). Cependant, le diagnostic devient plus difficile s'il vient à manquer plusieurs caractères; c'est le cas des bactéries non pigmentées et inactives sur les glucides, dont il sera parlé plus loin (Thibault [73]), et la distinction proposée par Galarneault et Leifson [24] et par Leifson [48], entre *Lophomonas* et *Pseudomonas*, basée essentiellement sur une ciliature différente, peut être difficile à faire en pratique.

Si, dans la définition du genre *Pseudomonas*, on exclut la production de pigments diffusibles, il devient possible de grouper dans ce genre des bactéries ne donnant jamais de pigments diffusibles, mais ayant, par ailleurs, tous les caractères du genre. C'est le cas notamment pour *Malleomyces pseudo-mallei* qui, après des fortunes diverses, est décrit actuellement dans le *Bergey's Manual* (Breed et coll. [9]) sous le nom de *Pseudomonas pseudo-mallei*, tout à côté de *Ps. aeruginosa*.

Ce rapprochement, souhaité par tous les expérimentateurs qui ont étudié la physiologie et la morphologie des deux espèces, ne pourra qu'être fructueux pour les progrès futurs de la bactériologie.

RÉSUMÉ.

L'examen de plus de 100 souches pigmentées de *Pseudomonas*, par des techniques qui sont indiquées, a conduit à définir un certain nombre de propriétés constantes chez ces bactéries.

Certains caractères sont essentiels : mobilité par cils polaires, aérobiose stricte en gélose-profonde sans nitrate, réaction de la cytochrome-oxydase positive, catabolisme oxydatif du glucose et transformation de certains aldoses en acides aldobioniques correspondants. D'autres caractères semblent également constants : croissance en milieu synthétique-ammonium-citrate, production de NH_3 , absence de production d'indole, absence de lysine-décarboxylase, catabolisme de l'arginine. Toutes ces propriétés doivent être recherchées avec des techniques dont les modalités sont discutées.

Ces caractères constants doivent permettre une définition correcte du genre *Pseudomonas*, permettant d'exclure de ce genre,

par exemple, les bactéries péricitriques ou fermentatives. D'autre part, il apparaît nécessaire de regrouper autour des deux espèces principales, *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens*, un grand nombre d'espèces décrites dans la littérature ; la distinction d'un groupe phytopathogène ne semble pas justifiée.

Les principaux caractères permettant la différenciation de *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens* sont indiqués ; les plus importants sont : la culture à 42° C, la réaction au jaune d'œuf, l'action des bactériophages et la structure antigénique O.

La production de pigment par les *Pseudomonas* est considérée comme un événement variable, soumis à des influences diverses qui sont rappelées, et dont l'absence ne justifie pas une exclusion du genre *Pseudomonas*.

★
★ ★

Nous remercions vivement les Docteurs : Elisabeth O. King, du Centre des Maladies infectieuses de Chamblee (Georgia) ; H. Kleinmaier, de l'Université de Heidelberg ; W. Köhler, de l'Université de Rostock ; L. Le Minor, de l'Institut Pasteur de Paris ; F. Litalien et M. Barme, de l'Institut Pasteur de Saïgon (Viet-Nam) ; O. Sandvik, du Collège Vétérinaire de Norvège (Oslo), pour les souches qu'ils nous ont aimablement fait parvenir.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALFORD (J. A.). *J. Bact.*, 1960, **79**, 591.
- [2] ANDRIEU (G.), MONNIER (J.) et BOURSE (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 176 et 322.
- [3] AZOULAY (E.) et SENEZ (J.-C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **247**, 1251.
- [4] BARRON (E. S.) et FRIEDMANN (T. E.). *J. biol. Chem.*, 1941, **137**, 593.
- [5] MC BEE (R. H.), LAMANNA (C.) et WEEKS (O. B.). *Bact. Rev.*, 1955, **19**, 45.
- [6] BENTLEY (R.) et SLECHTA (L.). *J. Bact.*, 1960, **79**, 346.
- [7] BUTTIAUX (R.) et GAGNON (P.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958, **10**, 119.
- [8] BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 43.
- [9] BREED (R. S.), MURRAY (E. G. D.) et SMITH (N. R.). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, the Williams and Wilkins Co, Baltimore, 7^e édit., 1957.
- [10] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 397.
- [11] CASARÈS-GILL (cité par GALLI-VALERIO). *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 1915, **76**, 233.
- [12] CÉSAIRE (O.-G.), BOIRON (H.) et NEUZIL (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 1427.
- [13] CHRISTENSEN (B. W.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 461.
- [14] CLARKE (P. H.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **12**, 337.

- [15] DUMAS (J.). *Bactériologie Médicale* (Collection Médico-Chirurgicale à révision annuelle), Flammarion, édit., Paris, 1951.
- [16] EAGON (R. G.). *Canad. J. Microbiol.*, 1958, **4**, 1.
- [17] ELLIOTT (R. P.). *Appl. Microbiol.*, 1958, **6**, 241.
- [18] ENTNER (N.) et DOUDOROFF (M.). *J. biol. Chem.*, 1952, **196**, 853.
- [19] EWING (W. H.) et JOHNSON (J. G.). *Int. Bull. Bact. Nom. Taxon*, 1960, **10**, 223.
- [20] FRIEDMAN (B. A.) et CEPONIS (M. J.). *Science*, 1959, **129**, 720.
- [21] GABY (W. L.). *Int. Bull. Bact. Nom. Taxon*, 1955, **5**, 153.
- [22] GABY (W. L.) et HADLEY (C.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 356.
- [23] GABY (W. L.) et FREE (E.). *J. Bact.*, 1958, **76**, 442.
- [24] GALARNEAULT (T. P.) et LEIFSON (E.). *Canad. J. Microbiol.* 1956, **2**, 102.
- [25] GESSARD (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1920, **34**, 88.
- [26] GESSARD (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1920, **171**, 323.
- [27] GORDON (J.) et Mc LEOD (J. W.). *J. Path. Bact.*, 1928, **31**, 185.
- [28] HABS (I.). *Z. Hyg.*, 1957, **144**, 218.
- [29] HAMON (Y.). [A paraître.]
- [30] HAYNES (W. C.). *J. gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 939.
- [31] HOFF (J. C.) et DRAKE (C. H.). *J. Bact.*, 1960, **80**, 420.
- [32] HUGH (R.) et LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 24.
- [33] JACHERTS (D.). *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 1959, **176**, 256 ; *Zbl. Bakt., II Abt.*, 1959, **113**, 111.
- [34] KATZNELSON (H.). *J. Bact.*, 1958, **75**, 540.
- [35] KING (E. O.), WARD (M.) et RANEY (D. E.). *J. Lab. clin. Med.*, 1954, **44**, 301.
- [36] KLEINMAIER (H.). *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 1957, **170**, 570.
- [37] KLEINMAIER (H.) et QUINCKE (G.). *Arch. Hyg.*, 1959, **143**, 125.
- [38] KLINGE (K.). *Arch. Mikrobiol.*, 1959, **33**, 1.
- [39] KLINGE (K.). *Arch. Mikrobiol.*, 1959, **34**, 270.
- [40] KLINGE (K.) et GRAF (W.). *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 1959, **174**, 243.
- [41] KLINGE (K.). *Arch. Hyg.*, 1960, **144**, 263.
- [42] KNIGHT (B. C. J. G.) et PROOM (H.). *J. gen. Microbiol.*, 1950, **4**, 508.
- [43] KÖHLER (W.). *Z. Immunforsch.*, 1957, **114**, 282.
- [44] KÖHLER (W.). *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 1959, **176**, 476.
- [45] KOVACS (N.). *Nature*, 1956, **178**, 703.
- [46] LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 377.
- [47] LEIFSON (E.). *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 1958, **173**, 487.
- [48] LEIFSON (E.). *Atlas of bacterial flagellation*, Academic Press, New York et Londres, 1960.
- [49] LEVENSON (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **56**, 634.
- [50] LIU (P. V.). *J. Bact.*, 1952, **64**, 773.
- [51] LIU (P. V.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 718.
- [52] LUTZ (A.), SCHAEFFER (A.) et HOFFERER (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 49.
- [53] VAN NIEL (C. B.) et ALLEN (M. B.). *J. Bact.*, 1952, **64**, 413.
- [54] MARTINEAU (B.) et FORGET (A.). *J. Bact.*, 1958, **76**, 118.
- [55] MOORE (H. B.) et PICKETT (M. J.). *Canad. J. Microbiol.*, 1960, **6**, 35.
- [56] ØRSKOV (J.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1958, **43**, 267.
- [57] PATON (A. M.). *Nature*, 1959, **184**, 1254.

- [58] PIÉCHAUD (M.). *Cours de Microbiologie de l'Institut Pasteur*, Paris, 1958.
- [59] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, 1957, Masson et C^{ie}, Paris, 3^e édit.
- [60] RHODES (M. E.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 639.
- [61] RHODES (M. E.). *J. gen. Microbiol.*, 1959, **21**, 221.
- [62] SANDVIK (O.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1960, **48**, 56.
- [63] SCHERRIS (J. C.), PRESTON (N. W.) et SHOESMITH (J. G.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **16**, 86.
- [64] SCHERRIS (J. C.) et SHOESMITH (J. G.). *J. gen. Microbiol.*, 1959, **21**, 389.
- [65] SCHNEIERSON (S. S.), AMSTERDAM (D.) et PERLMAN (E.). *Antibiot. Chemother.*, 1960, **10**, 30.
- [66] SELEEN (W. A.) et STARK (C. N.). *J. Bact.*, 1943, **46**, 491.
- [67] SIMON (R. D.). *Brit. J. exp. Path.*, 1956, **37**, 494.
- [68] SNEATH (P. H. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **17**, 184 et 201.
- [69] STANIER (R. Y.). *J. Bact.*, 1943, **46**, 213.
- [70] STERN (I. J.), WANG (C. H.) et GILMOUR (C. M.), *J. Bact.*, 1960, **79**, 601.
- [71] STOKES (F. N.) et CAMPBELL (J. J. R.). *Arch. Biochem.*, 1951, **30**, 121.
- [72] THIBAUT (P.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 551.
- [73] THIBAUT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961. Suppl. au numéro de juin, p. 59.
- [74] TOBIE (W.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 685.
- [75] TURFITT (G. E.). *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1323, et 1937, **31**, 212.
- [76] VÉRON (M.) et CHATELAIN (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 253.
- [77] VÉRON (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961 (à paraître).
- [78] WARREN (R. A. J.), ELLS (A. F.) et CAMPBELL (J. J. R.). *J. Bact.*, 1960, **79**, 875.
- [79] WASSERZUG (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1887, **1**, 581.
- [80] WILSON (G. S.) et MILES (A. A.). *Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*, 4^e édit., Arnold, Londres, 1955, **1**, 599.
- [81] WREDE (F.). *Z. Hyg.*, 1930, **111**, 90.

PSEUDOMONAS NON PIGMENTÉS ET ACHROMOBACTER

par R. BUTTIAUX.

(Centre d'Enseignement et de Recherches
de Bactériologie Alimentaire de l'Institut Pasteur de Lille)

Certains bactériologistes jugeront discutable le titre de cet exposé. Il met en cause, en effet, une question controversée de la systématique bactérienne.

Pour Prévot [4], le genre *Pseudomonas* réunit les bâtonnets mobiles à Gram négatif produisant un pigment bleu ou vert-jaune, soluble dans l'eau et diffusant dans le milieu. Il ne saurait donc exister, pour lui, de *Pseudomonas* apigmentés que nous trouvons rangés dans le genre *Achromobacter* ou dans la tribu des *Achromobactereae* groupant les bacilles incolores à Gram négatif, mobiles grâce à des cils polaires ou péritriches. Dans ce système, *Pseudomonadeae* et *Achromobactereae* appartiennent à la même famille des *Pseudomonadaceae*.

Pseudomonas et *Achromobacter*, au contraire, dépendent de familles distinctes, dans le manuel de Bergey [2], celle des *Pseudomonadaceae* et celle des *Achromobacteraceae*, respectivement. Le premier genre comprend les cellules immobiles ou à cils polaires avec ou sans pigment, et le second, les bacilles à Gram négatif non pigmentés, immobiles ou mobiles par des cils péritriches exclusivement.

Ces classifications, qui ont toutes deux une diffusion mondiale, s'opposent sur deux points importants :

1° Prévot refuse à la position des flagelles une valeur taxinomique ; il range dans les *Achromobacter* des germes pourvus de cils polaires ou péritriches. Dans le manuel de Bergey, au contraire, elle différencie même les ordres. Ainsi, dans la dernière édition de ce livre, les Schizomycètes sont subdivisés en Pseudomonales, réunissant les bactéries à cils polaires, et Eubactériales proprement dites, groupant celles à flagelles péritriches.

2° Le système de Prévot confère à la pigmentation une importance particulière. La tribu des *Chromobactereae* groupe la majeure partie des bacilles à Gram négatif pigmentés ; à côté

des *Chromobacterium*, des *Flavobacterium*, on trouve les *Serratia* classées par Bergey dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Ceux qui ont revu les différentes éditions du manuel de cet auteur attachent, au contraire, peu ou pas d'importance à la production de pigment ; dans les genres qu'ils définissent, on trouve souvent un mélange d'espèces capables ou non de le synthétiser.

Il faut une sérieuse compétence pour discuter les problèmes de taxinomie. Nous ne la possédons pas et ce n'est pas dans ce but que nous avons étudié les *Pseudomonas* et les *Achromobacter* [3]. Notre intention était de mettre à la disposition des bactériologistes des moyens simples pour identifier ces bactéries trouvées avec une particulière fréquence dans les milieux extérieurs, mais aussi, de plus en plus souvent, chez l'homme et les animaux à sang chaud, sains ou malades.

Les travaux poursuivis depuis plusieurs années nous font attribuer de la valeur à la position des flagelles et moins à la pigmentation. Cette opinion est fondée sur les résultats de milliers d'examens et sur des arguments que nous résumons ci-dessous.

1° *L'importance du système ciliaire.* — En observant certaines précautions, la position des cils est stable. Elle va de pair pour chaque groupe de bactéries avec d'autres propriétés majeures d'ordre physiologique ou enzymologique. Les *Serratia*, par exemple, pourvues de cils péritriches possèdent un ensemble de caractères biochimiques absolument différents de ceux des *Xanthomonas* munis de cils polaires. Cependant, il faut étudier cette ciliature dans des conditions précises trop négligées. Ainsi, chez une bactérie halophile, nous avons noté des variations du système ciliaire dépendant de trois facteurs : concentration du milieu en chlorure de sodium, teneur en agar et température d'incubation [4] ; ils intervenaient dans l'apparition de cils péritriches à côté d'un cil polaire constant. De même Leifson et Hugh [5] ont signalé chez des *Aeromonas* la présence de flagelles péritriches chez les cellules jeunes alors que leur ciliature est habituellement polaire. Ces phénomènes épisodiques ne concernent pas, en tout cas, la question présente ; ils n'ont jamais été observés chez les *Pseudomonas*, tout au moins chez les souches d'isolement assez récent.

2° *La pigmentation.* — La propriété de synthétiser un pigment n'est pas constante pour les cellules d'une souche, chez une espèce et à plus forte raison dans un genre. Sans accepter l'ensemble de la définition du genre *Serratia* proposé par Davis et coll. [6], on doit y reconnaître avec eux la fréquence des souches non pigmentées ; des isolements répétés décèlent souvent, d'ailleurs, des colonies apigmentées au sein des populations chromogènes. Chez

les *Pseudomonas*, l'apparition de la fluorescéine dépend de multiples facteurs différents pour chaque souche [7] ; certains agissent favorablement mais de façon apparemment empirique ; c'est le cas du maltose incorporé au milieu de Sabouraud [8].

La composition du milieu joue un rôle important ; celui de King [9] permet de déceler la fluorescéine chez des souches considérées comme achromogènes. La pigmentation survient parfois, d'ailleurs, de façon imprévisible : un bacille à Gram négatif de notre collection appelé *Achromobacter* selon Prévot, est devenu fluorescent en lumière de Wood après six ans de conservation et sans raison décelable ; il produit maintenant une fluorescéine visible à l'œil nu sans qu'aucun de ses caractères morphologiques et biochimiques soit modifié. On peut soupçonner que tous les *Pseudomonas* sont potentiellement capables de synthétiser du pigment ; il paraît périlleux, pourtant, d'estimer qu'une bactérie possédant les caractères majeurs du genre mais apigmentée au moment de l'examen ne lui appartient pas.

Pour définir un genre, on ne doit pas tenir compte seulement d'une ou de deux propriétés. Il faut en réunir un ensemble donnant aux bactéries une identité morphologique et surtout physico-chimique nettement distincte, sous plusieurs aspects, de celle des germes des autres familles ou genres. De patientes recherches sont nécessaires pour y parvenir ; l'exemple nous en est donné par Rhodes [10] dans son étude sur les *Pseudomonas fluorescens*. Elles paraîtront inutiles à ceux qui négligent les rigueurs de la systématique bactérienne. Ceux-là classent volontiers et trop facilement les germes dont nous parlons ici dans le vague groupe des « *Pseudomonas-Achromobacter* ». Leur identification a, en réalité, un intérêt pratique. Ils sont, en effet, les agents fréquents des altérations de nombreux produits alimentaires. Ils sont différemment sensibles aux procédés modernes de leur stabilisation, et ceci prouve déjà qu'ils ont un comportement physiologique différent. On doit donc les identifier soigneusement pour savoir, dans chaque cas particulier, le bénéfice éventuel à retirer de telle ou telle de ces méthodes de traitement.

I. — LES *Pseudomonas* NON PIGMENTÉS.

Nous avons proposé de dénommer *Pseudomonas* les « bactéries à Gram négatif de forme bacillaire, asporulées, mobiles par des cils polaires (monotriches, amphitriches ou lophotriches). Elles peuvent être pigmentées ; l'un au moins des pigments est alors soluble dans l'eau et diffuse dans le milieu ; la fluorescéine est le plus fréquent. Certaines espèces ou souches ne synthétisent pas de pigment et constituent l'ensemble des *Pseudomonas* non pig-

mentés. Aérobie strictes, elles possèdent une oxydase. Elles oxydent généralement le glucose ; certaines, pourtant, ne l'attaquent pas ».

Cette définition nécessite l'étude des caractères les plus importants. Nous insisterons sur ceux qui permettent la distinction entre *Pseudomonas* non pigmentés et *Achromobacter*.

MORPHOLOGIE.

a) *Le corps bactérien.* — Sa forme a une importance indéniable. Les *Pseudomonas* sont des bacilles droits ou parfois légèrement incurvés, toujours beaucoup plus longs que larges ($0,6 \times 1,6 \mu$ en moyenne). Les *Achromobacter*, par contre, se présentent sous la forme de coccobacilles ($0,4 \times 0,6 \mu$) simulant parfois les cocci. Ce dernier aspect est accentué dans les cultures jeunes : ultérieurement, on voit apparaître assez souvent quelques cellules plus nettement bacillaires.

b) *Le système ciliaire.* — En dehors des possibilités restreintes d'examen en microscopie électronique, il exige une coloration pour être examiné. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées à cet effet ; celle de Casares-Gil demande un suffisant entraînement du manipulateur ; celle de Leifson [41], plus récente, donne de bons résultats mais inconstants ; Rhodes [42] a décrit un procédé de coloration à l'argent qui nous a donné entière satisfaction. Nous l'utilisons systématiquement car il est simple et rapide. Comme toutes les techniques, pourtant, il convient rarement pour les souches possédant une abondante substance muqueuse. Elles doivent en être débarrassées au préalable ; nous employons, à cet effet, la méthode de Warren et Gray [43] ; elle consiste à émulsionner les germes dans de l'eau bidistillée additionnée d'hyaluronidase (0,1 mg pour 1 millilitre). Enfin, quelle que soit la méthode employée, il est indispensable, naturellement, de rechercher les flagelles sur des souches dont la mobilité a été suffisamment entraînée.

Dans ces conditions, les 620 *Pseudomonas*, pigmentés ou non, examinés dans notre service depuis trois ans, sont pourvus d'un système ciliaire polaire, à l'exclusion de tout autre. Dans une même colonie, on trouve des cellules possédant des flagelles monotriches, amphitriches ou lophotriches. Certaines souches présentent d'une façon plus constante l'une de ces trois dispositions, seulement. Cette irrégularité nous incite, dans le cadre de cet exposé, à diviser simplement les bactéries en trois groupes : à flagelles polaires, à flagelles péritriches, et non ciliées, et à abandonner les définitions plus compliquées de Leifson [41], sans méconnaître leur utilité pour d'autres groupes ou espèces.

c) *La coloration de Gram.* — Les *Pseudomonas* pigmentés ou non ne conservent pas la coloration de Gram ; avec le traitement habituel par l'alcool éthylique, la totalité de la cellule est décolorée. Les *Achromobacter* se présentent souvent, au début de leur multiplication et même parfois beaucoup plus tard, comme un mélange d'éléments à Gram positif et à Gram négatif. Ce phénomène est particulièrement fréquent chez les germes appelés *Alcaligenes viscosus* et chez certaines souches de *B. anitratum*.

PHYSIOLOGIE ET CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.

a) *Type respiratoire.* — En utilisant la méthode décrite par ailleurs [14] et le milieu viande-foie (V. F.) employé plus particulièrement pour la culture des anaérobies (glucosé à 2 p. 1 000), les *Pseudomonas* et les *Achromobacter* sont strictement aérobies.

b) *Mobilité.* — L'examen microscopique entre lame et lamelle ne fournit pas de renseignements suffisamment précis, car d'assez nombreuses souches peuvent être peu mobiles lors de leur premier passage sur les milieux artificiels de culture. Nous préférons employer l'observation macroscopique des piqûres d'ensemencement dans des culots de gélose molle :

Tryptose (Difco)	10 g
ClNa	5 g
Bacto-agar (Difco)	5 g
Eau distillée	1 000 ml
pH 7,2.	

Dans ces conditions, tous les *Achromobacter* que nous avons pu examiner sont immobiles ; les *Pseudomonas*, par contre, sont toujours mobiles. Une remarque importante doit être faite à ce sujet ; certaines souches, lors de leur isolement ou d'autres conservées depuis longtemps dans des collections, peuvent paraître immobiles. Un entraînement sur gélose molle montre qu'il n'en est rien ; la mobilité apparaît plus ou moins rapidement mais finit par être manifeste et souvent importante.

c) *Température optima de culture.* — 122 *Pseudomonas* pigmentés ou non et *Achromobacter* ont été ensemencés sur une gélose nutritive à la tryptose (Difco) et incubés à + 4°, + 22°, + 37° et + 44° durant trente jours.

Nous avons noté que :

80 souches cultivent à + 4° (65,67 p. 100) ;
122 souches cultivent à + 22° (100 p. 100) ;
45 souches cultivent à + 37° (36,88 p. 100) ;
35 souches cultivent à + 44° (28,68 p. 100).

Le comportement des deux groupes de germes à ces différentes températures est indiqué dans la figure 1.

Leur possibilité de culture à telle ou telle d'entre elles est fonction de leur origine ou de l'espèce en cause :

1° Les *Pseudomonas aeruginosa* cultivent à 44°.

2° Les *Achromobacter* et *Pseudomonas* des denrées alimentaires ou d'eaux de rivière se développent entre + 4° et + 37° ; ceux isolés des plantes ont une large zone de tolérance allant de + 4° à + 44° ; les germes provenant de prélèvements humains

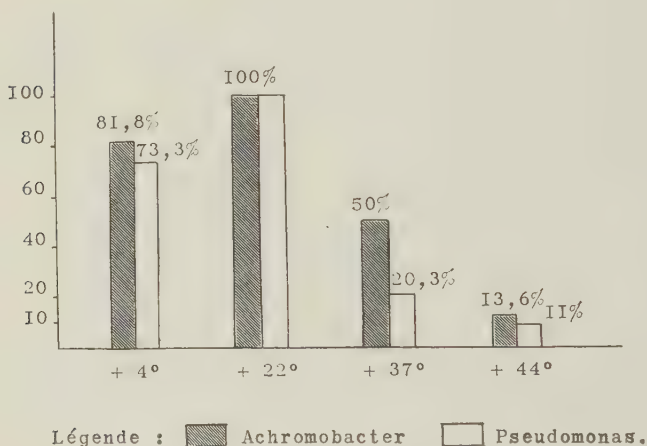


FIG. 1.

ou d'animaux à sang chaud se multiplient assez rapidement à + 44°. On notera que des *Pseudomonas* non pigmentés isolés de matières fécales humaines cultivent facilement à 37°, mais beaucoup plus difficilement ou pas du tout à 44°.

La température optima de développement, en tout cas, est celle de 22° ; on l'adoptera pour l'étude des souches d'origine inconnue.

d) *Aspect des colonies sur milieux solides.* — On a décrit l'aspect particulier des colonies de *Ps. aeruginosa* sur gélose nutritive ; il est moins fréquent chez *Ps. fluorescens*.

Pour les variétés non pigmentées, Gaby et Free [15] signalent trois images : 1° les colonies larges, envahissantes, à centre smooth, convexe et translucide et à périphérie plate, diffuse, à bords irréguliers ; 2° les colonies rondes, convexes, finement granuleuses ou muqueuses, à bords réguliers ; 3° les colonies à bords irréguliers, à centre ombiliqué, de texture granuleuse, d'aspect

rough. Cette description correspond aux aspects de notre expérience ; ils se rapprochent de ceux rencontrés pour les formes pigmentées.

Les colonies d'*Achromobacter* sont généralement plus petites que celles des *Pseudomonas* non pigmentés. Elles sont rondes, à contours nets, et sans tendance à diffuser ; examinées par transparence, elles sont homogènes et plus opaques.

e) *Pigmentation*. — Les pigments des *Pseudomonas* ne se manifestent pas avec une égale constance et intensité sur les diverses variétés de milieux liquides ou solides. Ce phénomène est bien connu et beaucoup d'auteurs ont recommandé des préparations différentes pour l'éviter. La majorité des bactériologistes reconnaît, aujourd'hui, la supériorité des milieux de King [9], et en particulier du milieu B. Dans ces conditions, on peut appeler *Pseudomonas* non pigmentés ceux qui ne synthétisent aucun pigment hydrosoluble décelable en lumière de Wood après une incubation prolongée à la température optima de développement. Cette appellation ne peut pas être considérée comme définitive. Au cours de leur conservation, certaines souches achromogènes, à un moment imprévisible, produisent de la fluorescéine ; cette propriété apparaît plus souvent, selon nos observations, sur gélose nutritive additionnée de 1 p. 1 000 de nitrate de potassium. D'autres, par contre, restent apigmentées au cours d'observations prolongées de plusieurs dizaines d'années. Sur le milieu B de King, en lumière de Wood, aucun *Achromobacter* n'est fluorescent ; aucun pigment n'est décelable, non plus, en lumière ordinaire.

f) *Oxydase et cytochrome-oxydase*. — La connaissance de ces systèmes a transformé l'étude des bacilles à Gram négatif. Elle met à notre disposition un test nouveau d'une grande utilité pour leur définition.

Différentes techniques peuvent être utilisées. Nous rappellerons, pour l'oxydase, celle de Gordon et McLeod [16] utilisant le chlorhydrate de para-diméthyl-phénylène-diamine qu'on peut avantageusement remplacer par l'oxalate beaucoup plus stable. Nous préférons la méthode de Kovacs [17] : au centre d'un petit fragment de papier-filtre (Whatman 1) placé sur une lame de verre on dépose deux à trois gouttes d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de tétra-méthyl-para-phénylène-diamine-hydro-chlore ; on prélève un peu de la souche à étudier (colonie sur gélose) au moyen d'un fil de platine et on l'étale en strie sur le papier imbibé du réactif. Une coloration violet brunâtre survenant immédiatement prouve l'existence d'une oxydase. Il ne faut pas tenir compte des réactions plus tardives.

Gaby et Hadley [48] recherchent la cytochrome *c* oxydase de la façon suivante : à 5 ml d'une culture en bouillon de douze à dix-huit heures du germe à étudier, on ajoute 0,3 ml d'une solution aqueuse à 1 p. 100 d'oxalate de para-amino-diméthyl-aniline, puis 0,2 ml d'une solution alcoolique à 1 p. 100 d' α -naphtol. On agite vigoureusement. L'apparition rapide d'une couleur bleu outremer (bleu d'indophénol) indique l'existence d'une cytochrome oxydase. Ewing et Johnson [49] ont adapté ce procédé aux cultures en milieu solide. Le germe est cultivé sur gélose nutritive ; après dix-huit à vingt-quatre heures d'incubation, on verse alors à sa surface deux à trois gouttes de chacun des réactifs suivants :

1° Solution à 1 p. 100 d' α -naphtol dans l'alcool à 95° ;

2° Solution à 1 p. 100 d'oxalate de para-amino-diméthylamine dans l'eau distillée.

On agite doucement pour qu'elles recouvrent les colonies. Une réaction positive se traduit par une couleur bleu intense qui doit survenir en deux minutes, au plus. Cette technique donne d'excellents résultats.

Dans notre service, M^{me} Viarre a mis au point un procédé simple permettant de déceler successivement l'oxydase puis la cytochrome oxydase : dans un tube de verre de 12 x 80 mm, on place 0,5 ml (10 gouttes) d'une solution aqueuse à 1 p. 100 d'oxalate d'amino-diméthyl-aniline ; on ajoute 2,5 ml environ d'une culture de 18-24 heures du germe en eau peptonée ou en bouillon. On agite. Une coloration rose apparaissant en quelques secondes, traduit la présence d'une oxydase. On ajoute alors 0,25 ml (5 gouttes) d'une solution alcoolique d' α -naphtol à 1 p. 100. Une coloration rapide, bleu vif, survient s'il existe une cytochrome oxydase.

Dans un travail antérieur paru en 1959 [3], nous avons signalé que, dans ces conditions, 800 souches d'*Enterobacteriaceae* (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Providencia*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Cloaca*) s'avéraient démunies d'oxydase. Par contre, celle-ci existait chez 100 p. 100 des *Pseudomonas* examinés. Ewing et Johnson [49], en 1960, confirment ces résultats en recherchant la cytochrome oxydase. Leurs constatations, encore fragmentaires, permettent de diviser les bacilles à Gram négatif en deux groupes :

1° Oxydase — : *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Erwinia* et *Xanthomonas*.

2° Oxydase + : *Aeromonas*, *V. comma* et autres *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*.

La biologie des bactéries, comme celle des autres êtres vivants, met souvent en évidence des cas d'exception. Nous venons d'en

avoir un exemple avec les *Pseudomonas*. Le Dr Eddy, de Cambridge, a eu l'amabilité de nous envoyer deux souches de *Pseudomonas* pigmentés pathogènes des plantes, qui étaient dépourvues d'oxydase au moment de leur examen dans son laboratoire et dans le nôtre. Elles sont l'objet actuellement de recherches complémentaires.

Dans le cadre de cette étude, nous retiendrons que les *Pseudomonas* non pigmentés possèdent une oxydase ou une cytochrome oxydase. Nous envisagerons plus loin, la question plus complexe des *Achromobacter*.

g) *Oxydation du glucose*. — Les bactéries peuvent être divisées en quatre groupes d'après leur comportement sur les milieux glucosés appropriés : fermentantes, oxydantes, inertes et alcalinisantes.

Dans la fermentation, la molécule de glucose d'abord phosphorylée est rompue en deux molécules de triose qui sont transformées ensuite. Dans l'oxydation, il n'y a probablement pas de rupture en trioses ; la fraction aldéhydique est oxydée en un groupe carboxyl formant de l'acide gluconique. L'oxygène n'intervient pas dans le premier de ces processus ; il est indispensable dans le second.

Cette recherche du mode de transformation du glucose est aussi utile que celle des cytochromes oxydases pour la classification des bacilles à Gram négatif. Un système qui n'en tiendrait pas compte, mènerait certainement aux erreurs que les bactériologistes ont involontairement faites dans le passé, en désignant sous le nom de « fermentations sucrées » des processus très différents.

Le milieu de Hugh et Leifson [20] donne de bons résultats pour leur recherche. Il est décrit par Véron [14].

Dans le tube recouvert d'huile, l'oxygène ne peut intervenir. Si l'indicateur vire au jaune, la transformation du glucose qu'il traduit ne peut être due qu'à une fermentation. Dans ce cas, d'ailleurs, les deux tubes inoculés présentent le même virage. Au contraire, la bactérie qui oxyde le sucre, agit seulement dans le milieu au contact de l'air.

Pour les travaux de routine, on peut utiliser le milieu suivant :

Bacto-peptone (Difco)	2	g
Protéose peptone n° 3 (Difco)	10	g
ClNa	5	g
PO ₄ K ₂ H	0,3	g
Rouge de phénol	0,025	g
Bacto-agar (Difco)	5	g
Eau distillée	1 000	ml

ajusté à pH 7,6. On répartit des culots de 85 mm de hauteur environ (4 ml) dans des tubes de 8 x 180 mm. On autoclave vingt minutes à 120°. Au moment de l'emploi, on régénère au bain-marie bouillant pendant dix minutes. On ajoute une quantité suffisante d'une solution de glucose (stérilisée par filtration) pour obtenir une concentration finale en sucre de 1 p. 100. Lorsque la gélification est suffisante, on inocule le culot par une longue piqure centrale. On incube à la température optima de développement. L'oxydation se traduit par un virage au jaune dans la zone supérieure des 10 mm, les parties plus profondes du milieu restant rouges. Dans la fermentation, la coloration jaune s'étend à toute la hauteur du milieu et peut s'accompagner de bulles de gaz si la bactérie étudiée est aérogène. On peut ainsi observer, en même temps, la mobilité des germes anaérogènes.

Sur les deux milieux décrits, certaines bactéries n'attaquent pas le glucose ; dans ce cas, l'indicateur coloré ne vire pas ou vire vers la zone alcaline de pH. Ce dernier phénomène est dû à la libération de bases au cours de la transformation des matières protéiques. On dit alors que le germe est « inerte » ou « alcalinisant ».

Les études systématiques nécessaires pour classer les bacilles à Gram négatif dans les catégories oxydantes, fermentantes, inertes et alcalinisantes ne sont pas encore terminées. On peut cependant retenir des faits suffisamment confirmés :

Les *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Cloaca*, *Proteus* et *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Alcalescens-Dispar*, *Serratia*, *Erwinia*) et les *Aeromonas* fermentent le glucose ;

Les *Vibrio*, en général, se comportent de la même façon ; certaines espèces, pourtant, sont inertes ou alcalinisantes ;

Les *Pseudomonas* oxydent le glucose ; quelques souches alcalinisent et on les rencontre plus souvent parmi les variétés achromogènes ;

Les *Xanthomonas* et les *Flavobacterium* sont également oxydants ; pourtant, d'assez nombreux types oxydent d'abord le glucose puis le fermentent discrètement deux ou trois jours plus tard ;

Les *Alcaligenes*, comme leur nom l'indique, alcalinisent franchement les deux milieux de culture proposés ci-dessus.

Nous étudierons plus loin le comportement des *Achromobacter*.

La recherche des processus d'oxydation ou de fermentation n'est pas limitée naturellement à un seul sucre et peut être étendue à d'autres hydrates de carbone. Pour les genres dont il est question ici, cette extension est inutile. Nous signalerons pourtant que les *Pseudomonas* oxydants se comportent comme les *B. anitratum* sur la gélose lactosée à 10 p. 100 dont nous avons

donné la formule de composition par ailleurs [21]. Le lactose est oxydé en acide lactobionique, mais beaucoup plus lentement (deux à douze jours) que dans le cas des B5W (vingt-quatre heures). Cette observation montre que la définition du manuel de Bergey doit être revue ; les *Pseudomonas* attaquent généralement le lactose, au contraire de ce qu'on prétend.

Les caractères essentiels décrits ci-dessus : morphologie, système ciliaire, pigmentation, oxydase et cytochrome oxydase, oxydation ou fermentation du glucose, sont suffisants pour définir les *Pseudomonas* pigmentés ou non. D'autres, bien connus ou signalés par Rhodes [10] peuvent éventuellement les compléter :

1° Production d'ammoniaque libre sur eau peptonée ; après sept jours à 25° le milieu est alcalin (pH 8,6).

2° Absence de production d'indole et d'acétoïne, quand, pour les souches pigmentées, la fluorescéine ne masque pas la réaction colorée (Barritt ou O' Meara).

3° Utilisation constante du citrate de sodium sur les milieux de Koser ou de Simmons.

D'autres propriétés intéressantes sont décrites dans le travail consacré aux *Pseudomonas* pigmentés [14]. Nous ne parlerons pas non plus de la structure antigénique de ces bactéries qui a été l'objet, pour *Ps. aeruginosa*, de recherches de Véron [22].

II. — LES *Achromobacter*.

Les travaux réalisés depuis quelques années sur les *Pseudomonas* ont été fructueux. Nos connaissances sont maintenant suffisantes pour que l'identification des souches atypiques comme les achromogènes, ne pose plus de problème difficile quand elles sont rapidement mobiles ou quand elles oxydent franchement le glucose. Leur distinction avec les *Achromobacter* reste discutée, cependant, dans d'autres cas. Les bactériologistes conçoivent d'ailleurs ce dernier groupe de bactéries de façon très différente. Leur étude est moins avancée ou a fourni des résultats moins constants.

L'examen de 310 souches méritant le nom d'*Achromobacter* nous a montré que la majorité d'entre elles répondaient à la définition suivante : Bactéries de forme courte, coccobacillaires, asporulées, toujours immobiles. La majorité des cellules sont à Gram négatif mais certaines d'entre elles, jeunes ou même plus âgées, peuvent conserver cette coloration. Elles ne sont pas pigmentées. Aérobies strictes, elles possèdent ou ne possèdent pas d'oxydase. Elles ne fermentent jamais le glucose et ne l'oxydent pas. Elles

alcalinisent, en général, le milieu de Hugh et Leifson au contact de l'air.

Le groupe des *Achromobacter* ainsi délimité ne correspond pas à celui qui est décrit dans le manuel de Bergey. Il se rapproche plus du genre *Acinetobacter* de Brisou et Prévot [23]. Les caractères proposés, l'ont été après des observations signalées ci-dessous.

a) *Morphologie et mobilité.* — L'aspect coccobacillaire est constant et caractéristique. Les B5W dont il est parlé ailleurs [24] donnent des images identiques ou voisines. On ne peut le confondre avec la forme bacillaire allongée et généralement fine des *Pseudomonas*. La coloration de Gram sur les cultures jeunes étant retenue par une partie des cellules, des observateurs peu avertis peuvent les considérer comme des cocci Gram +, dans certains cas, tant la tendance à la forme coccoïde est prononcée.

Ces cellules sont immobiles et donc dépourvues de flagelles. Ce caractère oppose nettement notre groupe au genre *Achromobacter* du manuel de Bergey et à celui de Prévot. Tous deux, en effet, décrivent des *Achromobacter* mobiles, munis de cils péritriches. L'espèce type du genre appelée *Achromobacter liquefaciens* et qui aurait cette ciliature, est maintenant très discutée. Breed [2] pense qu'elle n'a probablement jamais existé et qu'il s'agit vraisemblablement d'un *Pseudomonas* non pigmenté. Malgré nos recherches poursuivies depuis dix ans, nous ne l'avons pas isolée dans les milieux naturels et les produits alimentaires où l'on avait quelque chance de la rencontrer. Nous ne pouvons nier l'existence des *Achromobacter iophagus*, *thalassius*, *delicatulus*, *xerosis*, *aquamarinus*, *guttatus*, *cycloclastes*, *pestifer* et *superficialis*, qui posséderaient la même mobilité. Nous dirons seulement que nous ne les avons pas rencontrés en possession des caractères signalés pour eux dans la littérature. Celle-ci, d'ailleurs, nous en donne des descriptions tellement incomplètes qu'on cherche souvent la raison de leur inclusion dans le genre *Achromobacter*. Nous avons, pourtant, trouvé des souches voisines mais elles étaient halophiles strictes. Il paraît discutable d'inclure dans la classification générale des bactéries aérobies celles qui possèdent ce caractère ; à notre avis, les germes halophiles stricts devraient être rangés dans un ensemble distinct, car les techniques utilisables pour leur étude, les résultats qu'elles fournissent, nos actuelles connaissances sur leur métabolisme, incitent à les envisager comme des organismes particuliers.

b) *Oxydase et cytochrome oxydase.* — Sur 31 souches étudiées complètement, 19 possèdent une oxydase et 12 n'en ont pas. Tous leurs autres caractères sont identiques, cependant. Celles qui en

en sont démunies se rapprochent ainsi des B5W dont il est parlé dans un autre exposé de ce fascicule [24]. Cette observation est importante ; l'équipement des bactéries en cytochrome-oxydase peut être considéré comme originel et donc utile pour leur classification. Si, au cours de recherches ultérieures employant des techniques plus sensibles, leur absence est confirmée, elle nécessitera vraisemblablement la subdivision du groupe proposé ici.

c) *Action sur le glucose.* — En employant le milieu de Hugh et Leifson, les 31 souches examinées alcalinisent franchement la partie superficielle du milieu au contact de l'air. Nous n'avons jamais observé d'oxydation du glucose, mais quelques-uns de nos correspondants étrangers nous ont signalé l'avoir remarquée parfois de façon très discrète.

Cette alcalinisation des milieux de culture est considérée comme caractéristique du genre *Alcaligenes*. Avec Brisou [25], on peut se demander si la définition d'un genre fondé sur cette propriété assez fréquente chez des germes très différents, est valable en taxinomie. Nous ne le pensons pas et sommes favorables à l'inculcation des *Alcaligenes* dans les *Achromobacter*. Pour nous, par exemple, l'*Alcaligenes viscosus* (*Alcaligenes viscolactis*) a l'ensemble des caractères que nous attribuons aux *Achromobacter*. Le cas des *Alcaligenes faecalis* mobiles par cils péritriches, reste à discuter. Nous avons signalé ailleurs [3] n'avoir jamais rencontré cette bactérie au cours de 3 000 coprocultures ; les souches semblant répondre à la définition telle qu'elle est donnée dans le manuel de Bergey (7^e édition), étaient des *Pseudomonas* non pigmentés ; certaines autres venant de collections et portant la même dénomination étaient des *Vibrio* alcalinisant le milieu de Hugh et Leifson. On se demande d'ailleurs si beaucoup de ces souches insuffisamment étudiées ne sont pas des *Agrobacterium*. C'est, semble-t-il, l'avis de Brand [26] qui visiblement conseillé par Carpenter, classe les « *B. alkaligenes* » isolés de 6 hémocultures dans les *Rhizobiaceae*.

En faisant intervenir la morphologie du corps bactérien et son système ciliaire, la distinction entre *Pseudomonas* non pigmentés et *Achromobacter* n'est pas difficile. D'autres tests ont été proposés et sont utiles pour la confirmer.

L'un d'eux a été décrit par Shewan, Hodgkiss et Liston [27]. Il fait appel à la différence de sensibilité de ces deux groupes à la pénicilline. Sa technique est résumée ci-dessous :

On inonde avec 3 ml d'eau salée à 8,5 p. 1 000, une culture de 24 heures sur gélose nutritive. On en porte une anse bouclée dans 5 ml d'eau peptonée ou d'eau salée. On étale à la surface d'une boîte de Petri (100 mm) contenant de la gélose nutritive (5 mm d'épaisseur) une goutte de la suspension obtenue. On dépose alors

un disque habituel de papier imbibé de pénicilline (2,5 U. O.). On incube à 25° et on mesure les zones d'inhibition après dix-huit à vingt-quatre heures.

Dans ces conditions, les *Pseudomonas* pigmentés ou non (28 souches) sont résistants à la pénicilline ; les *Achromobacter*, au contraire, y seraient sensibles, les zones d'inhibition variant de 30 à 50 mm. Ce comportement est discuté dans un autre article de ce fascicule [28]. On ne peut prévoir si le test de Shewan et coll. restera valable dans l'avenir. L'utilisation de plus en plus fréquente des antibiotiques pour la stabilisation des produits alimentaires où l'on rencontre plus particulièrement les *Achromobacter* peut, en effet, en modifier les résultats.

Sherris et coll. [29] ont décrit récemment une propriété des *Pseudomonas* qu'ils jugent intéressante pour leur identification : ils sont capables en deux heures de transformer plus de 50 p. 100 de l'arginine présente dans un milieu de culture déterminé. Cette destruction rapide n'a pas été constatée par eux chez les *Achromobacter*, les *B. anitratum*, les *Enterobacteriaceae* et chez quelques souches de *Vibrio*, *Moraxella* et *Xanthomonas*. En utilisant la technique qualitative de « Manchester » décrite par les auteurs, les résultats encore insuffisants obtenus par nous sont les suivants :

	SOUCHES ÉTUDIÉES	+	—
<i>Ps. aeruginosa</i>	71	71	0
<i>Ps. fluorescens</i>	7	7	0
<i>Pseudomonas non pigmentés</i> ...	16	11	5
<i>B. anitratum</i>	14	7	7
<i>Achromobacter</i>	11	0	11

Ils sont intéressants et doivent être complétés par d'autres recherches en cours. Il ne faut pas négliger ce test complémentaire utile, en tout cas, pour la distinction rapide des *Achromobacter* et des *Pseudomonas* non pigmentés, peu mobiles lors de leur examen.

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.

En tenant compte de la morphologie du corps bactérien, du système ciliaire, du mode d'action sur le glucose, des oxydase et cytochrome oxydase, il est actuellement possible de distinguer facilement les *Pseudomonas* non pigmentés des *Achromobacter* tels que nous avons proposé de les définir :

Pseudomonas non pigmentés : formes bacillaires mobiles par un système ciliaire exclusivement polaire : possèdent toujours une oxydase ou une cytochrome oxydase ; ne fermentent jamais

le glucose mais l'oxydant en général ou, plus rarement, ne l'attaquent pas.

Achromobacter : formes coccobacillaires immobiles ; possèdent ou non une oxydase et une cytochrome oxydase ; ne fermentent pas le glucose et ne l'oxydent pas en général ; alcalinisent le plus souvent le milieu de Hugh et Leifson.

La destruction rapide de l'arginine réalisée souvent par les *Pseudomonas* non pigmentés et jamais par les *Achromobacter* peut compléter les caractères ainsi retenus.

Ces définitions devront certainement être revues dans l'avenir. La question des *Pseudomonas* est maintenant convenablement éclaircie et nos connaissances à leur sujet sont suffisantes. Celle des *Achromobacter*, par contre, exige des études complémentaires ; il faut s'intéresser particulièrement aux formes mobiles décrites dans le passé et les examiner au moyen des techniques dont nous disposons aujourd'hui. Il en est de même pour les *Alcaligenes* mobiles, qui semblent voisins des *Achromobacter* ou des *Agrobacterium* ; on pourra les inclure dans l'un ou l'autre de ces groupes. Il est possible, en tout cas, en retenant les caractères signalés ci-dessus, d'établir des limites précises entre les *Enterobacteriaceae*, les *Vibrio*, les *Pseudomonas* et les bactéries que nous proposons d'appeler *Achromobacter*. L'examen des travaux publiés dans un passé récent montre que cette mise au point était nécessaire pour obtenir des résultats plus fructueux dans les recherches à poursuivre. Elle a, au moins, nous l'espérons, le mérite de clarifier une question difficile.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, 3^e édit., Masson et C^{ie}, Paris, 1957.
- [2] BERGEY. *Manuel of determinative bacteriology*, 7^e édit., Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1957.
- [3] BUTTIAUX (R.) et GAGNON (P.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-1959, **40**, 121.
- [4] BUTTIAUX (R.) et VOISIN (C.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-1959, **40**, 151.
- [5] LEIFSON (E.) et HUGH (R.). *J. Bact.*, 1953, **65**, 263.
- [6] DAVIS (B. R.), EWING (W. H.) et REAVIS (R. W.). *Int. Bull. Nom. Taxon.*, 1957, **7**, 151.
- [7] SELEEN (W. A.) et STARK (C. N.). *J. Bact.*, 1943, **46**, 491.
- [8] MARTINEAU (B.) et FORGET (A.). *J. Bact.*, 1958, **76**, 118.
- [9] KING (E. O.), WARD (M.) et RANEY (D. E.). *J. Laborat. Clin. Med.*, 1954, **54**, 301.
- [10] RHODES (M. E.). *J. gen. Microbiol.*, 1959, **21**, 221.
- [11] LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 377.
- [12] RHODES (M. E.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 639.

- [13] WARREN (G. H.) et GRAY (J.). *J. Bact.*, 1955, **70**, 152.
 - [14] VÉRON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 16.
 - [15] GABY (W. L.) et FREE (E.). *J. Bact.*, 1953, **65**, 746.
 - [16] GORDON (J.) et MC LEOD (J. W.). *J. Path. Bact.*, 1928, **31**, 185.
 - [17] KOVACS (N.). *Nature*, 1956, **178**, 703.
 - [18] GABY (W. L.) et HADLEY (C.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 356.
 - [19] EWING (W. H.) et JOHNSON (J. G.). *Int. Bull. Bact. Nom. Taxon.*, 1960, **10**, 223.
 - [20] HUGH (R.) et LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 24.
 - [21] BUTTIAUX (R.). *L'analyse bactériologique des eaux de consommation*, Flammarion, Paris, 1951.
 - [22] VÉRON (à paraître).
 - [23] BRISOU (J.) et PRÉVOT (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 722.
 - [24] PIÉCHAUD. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 74.
 - [25] BRISOU (J.). *Etude de quelques Pseudomonadaceae*, Baillet, édit., Bordeaux, 1958.
 - [26] BRAND (C. A.). *Acta tropica*, 1959, **16**, 244.
 - [27] SHEWAN (J. M.), HODGKISS (W.) et LISTON (J.). *Nature*, 1954, **73**, 208.
 - [28] CHABBERT (Y.) et COURTIEU (A.-L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 100.
 - [29] SHERRIS (J. C.), SHOESMITH (J. G.), PARKER (M. T.) et BRECKON (D.). *J. gen. Microbiol.*, 1959, **21**, 389.
-

A PROPOS D'ALCALIGENES FAECALIS

par P. THIBAUT.

(Institut Pasteur).

Peu de temps après sa description par Petruschky en 1896 [1], plusieurs bactériologistes ont considéré *Bacillus alcaligenes faecalis* comme le chef de file d'un groupe de bactéries. Leur opinion a reçu une sorte de consécration lorsque Castellani et Chalmers, en 1919 [2], en ont fait, sous le nom « *Alcaligenes faecalis* », l'espèce-type d'un genre nouveau. Le genre *Alcaligenes* comprenait alors 3 espèces, mais leur nombre n'a pas tardé à augmenter et à subir des fluctuations nombreuses suivant les époques et les auteurs. Des bactéries à caractère pathogène bien défini, comme *A. melitensis*, *A. abortus*, ont toléré peu de temps la parenté qu'on leur avait attribuée. Dans le *Bergey's Manual* (1957 [3]) figurent encore 6 espèces. Elles se distinguent les unes des autres par des caractères comme la mobilité, l'action sur la gélatine et le lait ; mais leur définition s'inspire généralement de travaux anciens qui n'ont été ni confirmés ni complétés.

Il est parfois bien difficile de donner un nom sans ambiguïté à certains germes trouvés au cours d'une analyse. Il n'est pas rare d'isoler de produits pathologiques, selles, urines, sang, liquide pleural, expectoration, etc., des bacilles Gram négatifs, dont les caractères observés d'abord sur un petit nombre de milieux orientent le diagnostic vers le groupe *Alcaligenes*. Ce sont des bacilles mésophiles, aérobies stricts, qui se développent relativement bien sur les milieux usuels, sans élaborer de pigment ; ils n'attaquent avec production d'acide ni glucose, ni lactose, ni mannitol, alcalinisent le petit-lait tournesolé, ne forment pas d'indole, ne possèdent pas d'uréase. S'ils sont mobiles et non protéolytiques, on pense à *A. faecalis*. Malheureusement, soixante années de discussion ne semblent pas avoir fait l'unanimité sur la morphologie de l'espèce-type. Certains auteurs ne précisent pas la disposition de son appareil ciliaire, d'autres exigent qu'elle soit péritriche, d'autres enfin n'ont jamais rencontré que des bacilles à ciliature polaire. Ce fut encore récemment le cas de Buttiaux et Gagnon (1958 [4]), qui ont examiné 122 souches provenant du milieu extérieur et de produits alimentaires.

Brisou et Prévot (1954 [5]) estiment excessive l'importance taxinomique accordée au bacille de Petruschky ; pour eux, aucun argument sérieux ne permet de défendre l'autonomie du genre *Alcaligenes* qui doit disparaître et se fondre dans le genre *Achromobacter*.

Les buts de ce rapport sont très limités : rappeler une situation confuse, faire part de quelques constatations personnelles réalisées au cours d'examen de cultures-types et de cultures récemment isolées, susciter enfin de nouveaux travaux qui permettent de leur attribuer une place logique dans la classification.

RAPPEL HISTORIQUE

Lorsque Petruschky (1896 [4]) a décrit le bacille qu'il avait isolé, d'abord de bière altérée, puis de selles humaines, il l'a fait en comparaison avec le bacille typhique avec lequel il craignait des confusions. Les deux germes possédaient une mobilité vive et une ciliature péritriche, se décoloraient par la méthode de Gram, avaient des colonies semblables, ne coagulaient pas le lait, ne formaient pas de gaz en milieux sucrés, n'élaboraient pas d'indole : le bacille de Petruschky se distinguait seulement par l'abondance du trouble en petit-lait tournesolé et l'alcalinisation de ce milieu en quarante-huit heures, l'épaisseur de l'enduit sur pomme de terre et l'absence de lyse *in vivo* dans l'épreuve de Pfeiffer, en présence d'un sérum anti-bacille d'Eberth.

Dans les années suivantes, plusieurs auteurs ont confirmé les caractères biochimiques et introduit des milieux différentiels sucrés avec indicateur de production d'acide. Berghaus a démontré une autre propriété fondamentale : l'aérobiose stricte.

Mais ni Berghaus (1905 [6]), ni Klimenko (1907 [7]) n'ont été capables de déceler dans les diverses souches qu'ils ont étudiées, même celles qu'ils avaient reçues de Petruschky, des bacilles à ciliature péritriche. Tous avaient des cils polaires et ressemblaient à des cultures de *Bacillus fluorescens*, non *liquefaciens*, ayant perdu la faculté de produire du pigment.

Des observations de ce genre ont amené beaucoup de bactériologistes à douter du bien-fondé de la description originale. Ainsi Lehmann et Neumann [8] ont décrit sous le nom de « *Vibrio alcaligenes* » Petruschky un bacille lophotriche qui paraît être pour eux le seul représentant du groupe physiologique *Alcaligenes*. *Vibrio alcaligenes*, *Alcaligenes faecalis* seront désormais souvent employés comme synonymes.

En 1930 cependant, Ryti [9] a signalé qu'elle avait isolé du sang ou de selles de malades 6 souches de bacilles péritriches, vivement mobiles. En 1935, Nyberg [10] a étudié 134 souches parmi lesquelles il a distingué deux groupes principaux : des bacilles courts

et trapus, peu mobiles, la plupart péricritiques, avec des cils habituellement peu nombreux, mal formés, donnant parfois l'impression d'être brisés, correspondraient au bacille de Petruschky ; des bacilles allongés, minces, quelquefois incurvés, vivement mobiles, munis de trois ou quatre cils polaires seraient identiques à *Vibrio alcaligenes* de Lehmann et Neumann. Les constatations de Turck (1952 [41]) sont assez voisines ; pour elle, cependant, la morphologie du corps microbien est plus importante que la disposition des cils ; les bacilles longs peuvent être péricritiques, mono ou lophotriches.

Conn (1940 [42], 1942 [43]) a décrit, lui aussi, le système ciliaire souvent imparfait mais péricritique de l'espèce-type du genre *Alcaligenes* et exclu de ce genre les bactéries à ciliature polaire. Il a constaté l'incapacité d'*A. faecalis* à se développer sur milieu synthétique minéral contenant du glucose comme seule source de carbone. Il a suggéré que cette propriété pouvait le différencier de bactéries du sol, très voisines.

Hugh et Leifson (1953 [44]), Leifson (1958 [45], 1960 [46]) ont distingué parmi les bacilles inactifs sur les hydrates de carbone trois types morphologiques : péricritique, lophotrichie, monotrichie, qu'ils proposent de classer respectivement dans les genres *Alcaligenes*, *Lophomonas* ou *Pseudomonas*. Ils ont décrit « *A. denitrificans* » (1954 [47]) qui se distingue d'*A. faecalis* par la réduction des nitrates en N moléculaire et la culture en anaérobiose en présence de nitrate. Galarneault et Leifson (1956 [48]) ont proposé le nom « *Lophomonas alcaligenes* » qui serait synonyme de « *V. alcaligenes* » Lehmann et Neumann pour des bacilles munis d'une touffe de deux à quatre cils polaires, décrivant rarement plus d'une ou deux courbes ; ces bactéries possèdent constamment une oxydase, ne sont pas gélatinolytiques, réduisent le nitrate en nitrite, produisent de l' SH_2 révélé par les sels de plomb, acidifient oxydativement le glycérol, etc.

Sarkar et coll. (1959 [49]) ont étudié 200 souches : 57 étaient immobiles et dépourvues de cils, 64 péricritiques ; 19 contenaient en mélange des cellules à ciliature péricritique ou polaire ; les 60 autres étaient monotriches ou amphitriches, mais les auteurs désignent tous ces microbes sous le nom *A. faecalis* et ne semblent pas attribuer de valeur taxinomique aux différents caractères morphologiques ou physiologiques qu'ils ont observés.

Moore et Pickett (1960 [20]), sur 40 souches évoquant par leurs caractères le genre *Alcaligenes*, ont trouvé seulement 6 péricritiques ; 4 étaient non ciliées, 24 étaient lophotriches, mais aucune ne correspondait exactement à la description de *Lophomonas alcaligenes*.

Hugh et Ryschenkow (1960 [21]) ont isolé à maintes reprises de produits pathologiques un bacille à ciliature polaire multitriche,

protéolytique, qu'ils nomment *Ps. maltophilia* et qui risque d'être confondu avec un *Alcaligenes*. Il ne produit, en effet, pas d'acide aux dépens du glucose, ni de la plupart des glucides, mais attaque par voie oxydative le maltose ; il est remarquable aussi par la possession d'une lysine-décarboxylase.

L'étude du métabolisme des composés azotés par *A. faecalis*, esquissée par Braun et Cahn-Bronner (1921 [22]), par Berthelot et M^{lle} Amoureux (1938 [23]), a été reprise par Denault, Cleverdon et Kulp (1953 [24]). Seuls de 39 composés organiques, l'acide aspartique, l'asparagine, l'histidine, le glutathion permettaient une multiplication abondante, mais les quatre cultures utilisées n'avaient pas un comportement uniforme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les études effectuées ont porté sur 53 souches. Le professeur Leifson et le Dr Hugh avaient aimablement envoyé 7 cultures et le professeur Cleverdon, 2 ; 5 souches provenaient de la National Collection of Types Cultures, 2 de la Collection de l'Institut Pasteur. Les 37 autres cultures avaient été reçues à ce laboratoire de la Collection pour examen ; toutes avaient été isolées récemment de sang, de liquide céphalo-rachidien, d'urines, d'expectorations, de suppurations et de produits pathologiques divers d'origine humaine, parfois aussi de plasma pour transfusion, de cultures de tissu ou de substances médicamenteuses contaminées, voire même de solutions de streptomycine.

Les techniques utilisées étaient généralement celles décrites dans le rapport de M. Véron [25].

Un examen préliminaire avait montré que tous ces bacilles mésophiles, mobiles, Gram-négatifs, étaient aérobies-stricts : ils se développaient exclusivement dans la zone superficielle de la gélose profonde dépourvue de nitrate ; pour cette raison, la méthode macroscopique de recherche de la mobilité par piqure dans un culot de gélose molle donnait des résultats d'interprétation souvent difficile, inférieurs à ceux de l'examen direct microscopique, la diffusion microbienne se faisant mal dans la masse du milieu.

Les bacilles n'élaboraient pas de pigment même sur milieu B de King (1954 [26]). Ils alcalinisaient d'emblée le petit-lait tournesolé. Ils alcalinisaient aussi les milieux liquides peptonés au glucose, lactose, mannitol, ou le milieu gélose « glucose-lactose-SH₂ ». Sur milieu « urée-indole », ils se montraient dépourvus d'uréase, de tryptophane-désaminase (Thibault et Le Minor, 1957 [27]), et ne formaient pas d'indole, pas plus qu'en eau peptonée. L'ensemencement en lait, en culots de gélatine nutritive, sur sérum coagulé manifestait ou non leur pouvoir protéolytique.

Un examen plus approfondi comportait la coloration de cils effectuée selon la méthode de Leifson (1951 [28]) ou celle de Rhodes (1958 [29]) qui donnent des résultats similaires ; la méthode de Leifson est plus rapide, fournit des images plus fines lorsqu'elle est parfaite, mais la préparation du colorant est plus délicate.

La recherche de l'oxydase était effectuée pour toutes les souches suivant le procédé de Kovacs [30], sur papier, avec une solution de chlorhydrate de tétraméthyl-paraphénylène-diamine à 1 p. 100. La recherche de la cytochrome-oxydase n'a pas été systématiquement pratiquée, mais surtout lorsque le test de l'oxydase avait paru un peu douteux : les résultats les plus indiscutables s'obtenaient en versant les deux réactifs de Gaby [31] sur les colonies isolées.

L'attaque des glucides était éprouvée selon la technique de Hugh et Leifson [14] sur milieu modifié par Véron et Chatelain (1960 [32]). Les tubes de macération gélosée, additionnée de glucose, lactose, maltose, saccharose, arabinose, xylose ou glycérol, restaient en observation pendant trois semaines à 37° ; dans quelques cas, l'épreuve était faite en double à 37° et à 30°, sans différence sensible. Quel que soit le virage final de l'indicateur, la culture provoquait d'abord, dans tous les cas, une alcalinisation de la surface.

Pour rechercher le développement en présence de sels minéraux et de glucose, on utilisait le milieu suivant :

NaCl	5 g
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	0,2 g
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Eau distillée	1 000 ml
Solution sodique à 1/500 de bleu de bromo-thymol	40 ml
Gélose lavée	20 g
pH 6,8.	

On l'ensemencait en strie, comme le milieu de Simmons, avec une suspension de bactéries prélevées d'une culture de 20 heures sur gélose ; on observait pendant quatre jours à 37°.

La recherche de réduction du nitrate en nitrite s'opérait sur des cultures en bouillon contenant 1 p. 1 000 de nitrate de K ; celle de H₂S sur gélose au sous-acétate de Pb. Avec ces germes aérobies-stricts le noircissement ne se produit jamais ni rapidement ni dans la profondeur du milieu, et l'interprétation ne peut se faire comme avec les *Enterobacteriaceae* ; un brunissement intense, même localisé en surface et survenant en deux ou trois jours, est considéré comme une réaction positive.

La transformation de la lysine en cadavérine était mise en évidence par la méthode de Carlquist modifiée [27], en utilisant un milieu « glucose-lactose-SH₂ » contenant une peptone trypsique de fibrine ou de caséine.

RÉSULTATS.

L'examen microscopique de 53 souches a conduit à distinguer deux groupes morphologiques que des caractères biochimiques permettent de subdiviser.

MORPHOLOGIE. — Tous les microbes étudiés ont une forme bacillaire, mais les uns sont courts et trapus, parfois cocciformes, les autres minces et allongés.

Les bacilles trapus ont leurs deux diamètres presque égaux mais présentent, simultanément, dans la plupart des cultures, quelques éléments plus allongés. Les cellules sont disposées isolément ou en diplobacilles, parfois en chaînettes ou en amas. En raison de leur petite taille, elles subissent dans les préparations à l'état frais de vifs mouvements browniens qui peuvent gêner l'appréciation de leur mobilité propre ; cette appréciation est plus facile en contraste de phase qu'en microscopie ordinaire ; on les voit alors se déplacer avec rapidité ; au cours de ce travail, il n'a jamais été nécessaire de procéder à un entraînement sur gélose molle.

Dans les préparations humides, additionnées d'encre de Chine, quelques individus peuvent paraître encapsulés ou entourés d'une substance « muqueuse » qui peut emprisonner de petits amas. Les

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Coloration de cils. Méthode de Rhodes. Gr. \times 1 300.

FIG. 1. — Bacilles pérित्रiches. Certaines cellules possèdent un ou deux cils seulement, mais leur insertion est tantôt polaire, tantôt latérale. Parfois aspect de « cil brisé ».

FIG. 2. — Bacilles lophotriches. Une touffe de deux à quatre cils à un pôle ou aux deux ; ils présentent une seule ou, au maximum, deux courbures ; leur longueur d'onde est relativement grande.

FIG. 3. — Bacilles monotriches. Un seul cil à un pôle ou aux deux ; courbures multiples.

FIG. 4. — Bacilles multitriches. Deux cils ou plus à un pôle ou aux deux ; ils présentent généralement deux courbures et souvent plus.



FIG. 1.



FIG. 2.



FIG. 3.



FIG. 4.

bactéries décolorées par la méthode de Gram, prennent bien et uniformément la fuchsine aqueuse ; quelques formes cependant peuvent présenter un espace clair central.

Les bacilles minces et allongés sont rectilignes, plus souvent un peu incurvés et quelquefois, surtout au moment de leur isolement, affectent la forme de vibrions. Ils sont animés d'une mobilité très vive, facile à observer. Disposés isolément ou en diplobacilles, parfois en filaments, ils peuvent aussi s'entourer de substance muqueuse. Ils se colorent par la fuchsine, uniformément ou avec un aspect bipolaire.

Après coloration de cils, les 13 souches de bacilles trapus se révèlent toutes, mais elles seules, munies d'un appareil locomoteur pérित्रиче. Cet appareil est, il est vrai, d'une richesse très différente d'une souche à l'autre et, pour certaines souches, d'une cellule à l'autre (pl., fig. 1). Dans quelques préparations, de nombreuses cellules sont atriches ou possèdent seulement un ou deux cils ; leur insertion tantôt polaire, tantôt latérale, doit éveiller l'attention [42], mais un examen prolongé et répété peut être nécessaire pour affirmer la disposition pérित्रиче.

Les bacilles longs doivent leur mobilité à un ou plusieurs cils à insertion exclusivement polaire. Différents aspects décrits par Leifson [18], lophotriche (pl., fig. 2), monotriche (pl., fig. 3), multitriche (pl., fig. 4) se trouvent, souvent, avec une prédominance constante pour une souche donnée ; il semble cependant, comme l'ont conclu Rhodes [29] et Buttiaux [4], que le nombre de cils leur longueur d'onde et leur amplitude sont des caractères trop variables, même sur une préparation provenant d'une colonie isolée, pour constituer une base solide de différenciation.

BIOCHIMIE. — *Les bacilles pérित्रичеs* (tableau I) ont en commun trois caractères physiologiques importants. Ils sont dépourvus de pouvoir protéolytique et de lysine-décarboxylase ; ils possèdent une oxydase. Cette oxydase se manifeste avec la méthode de Kovacs de façon constante, mais moins rapide et moins intense que celle de *Ps. aeruginosa*. La réaction de la cytochrome-oxydase effectuée sur les colonies est positive en moins de deux minutes, parfois en quelques secondes, comme l'ont observé Ewing et Johnson (1960 [33]).

Bien que le nombre de souches pérित्रичеs soit de 13 seulement, elles diffèrent entre elles nettement par leur comportement vis-à-vis du nitrate et des glucides. Six ont des caractères très homogènes ; elles ne réduisent pas le nitrate, ne forment pas de SH_2 ou des traces seulement après deux ou trois jours, elles utilisent le citrate comme source de carbone, ne se développent pas sur milieu minéral glucosé et n'attaquent aucun des glucides éprouvés

péritriche les trois caractères : absence de pouvoir protéolytique, absence de lysine-décarboxylase, présence d'oxydase. Dix de ces souches sont constituées de bactéries surtout lophotriches, les 5 autres de bactéries surtout monotriches ; elles ont cependant une grande uniformité dans les propriétés étudiées ; elles réduisent les nitrates en nitrite sans que la présence de nitrate modifie leur aérobiose stricte, elles ne produisent pas de SH_2 , elles n'utilisent pas le citrate ou faiblement et lentement, elles n'attaquent aucun des glucides à l'exception d'une souche qui oxyde le glycérol après sept jours de développement.

Vingt-quatre souches (tableau III) forment un ensemble caractérisé par quelques propriétés remarquables. Ces bacilles, à cilia-

TABLEAU III. — Bacilles à ciliature polaire, gélatinase +, lysine-décarboxylase +, oxydase —.

NOMBRE DE SOUCHES	RÉDUCTION DES NITRATES	UTILISATION DU CITRATE	PRODUCTION DE SH_2	ATTAQUE OXYDATIVE DE					
				glucose	maltose	lactose	saccharose	arabinose	xylose glycérol
6	(NO ₂) en général	— + tard. ou	+ général	—	+ (3-16)	—	—	—	—
13				+ (3-15)	+ (2-5)	—	—	—	—
4				+ (3-6)	—	—	—	—	—
1				—	—	—	—	—	—

ture polaire, à prédominance multitriche, provoquent dans la gélose inclinée sur laquelle ils ont cultivé pendant quelques jours un brunissement dont le mécanisme n'a pas été étudié. Ces germes ont un pouvoir protéolytique considérable qui se manifeste en vingt-quatre à quarante-huit heures sur la gélatine, le lait, le sérum coagulé ; ils ont une lysine-décarboxylase ; ils sont dépourvus d'oxydase et de cytochrome-oxydase. Leurs autres propriétés sont un peu plus variables. Avec quatre exceptions, ils réduisent les nitrates en nitrites ; sur gélose au Pb ils provoquent en trois jours un noircissement généralement considérable ; ils n'utilisent pas le citrate ; leur pouvoir glucidolytique, strictement oxydatif, diffère d'une souche à l'autre. L'une d'elle est complètement inactive, 4 attaquent uniquement le glucose en trois à six jours, 6 le seul maltose en trois à seize jours, 13 le maltose en deux à cinq jours puis secondairement le glucose, après un délai d'un ou plusieurs jours.

DISCUSSION.

Au cours de l'étude de 53 souches de bacilles mobiles, Gram négatifs, présentant sur les milieux usuels les propriétés morphologiques et physiologiques attribuées au genre *Alcaligenes*, une coloration de cils a conduit à distinguer nettement deux groupes : des bacilles à ciliature péritriche d'une part, des bacilles à ciliature polaire, d'autre part. Cette constatation confirme celles de Nyberg, Turck, Conn, Sarkar, Leifson et d'autres auteurs.

Un critère anatomique est généralement de grande valeur pour la distinction des genres ; on aimerait cependant qu'il ne soit pas unique. Dans le cas présent, l'aspect, tantôt trapu, tantôt svelte, du corps microbien paraît aller de pair avec la disposition des cils mais il n'est pas sûr, d'après les observations de Turck, que la coïncidence soit constante et les caractères biochimiques mis en évidence jusqu'ici ne permettent pas d'appuyer solidement la division morphologique.

Depuis quelques années, plusieurs publications incitent à considérer avec prudence les arguments taxinomiques tirés de la disposition polaire ou péritriche de l'appareil locomoteur : celles de Leifson et Hugh (1953 [34]) sur les *Aeromonas*, de Sneath (1956 [35]), de Leifson (1956 [36]) sur les *Chromobacterium*, de Buttiaux et Voisin (1958-59 [37]) sur un bacille halophile ; il y aurait chez ces bactéries coexistence des deux systèmes ou alternance suivant la phase de croissance ou la composition du milieu ; mais il suffit d'opérer dans des conditions toujours identiques pour lever toutes difficultés. Il en est une, plus grave peut-être, qui résulte d'une observation faite par Leifson et Hugh (1953 [38]) de la mutation d'une bactérie lophotriche à la disposition péritriche : le mutant était indistinguishable d'*Alcaligenes faecalis*. Mais cette observation, répétée à plusieurs reprises, n'a jamais pu être renouvelée avec aucune autre souche. Leifson [18] estime lui-même qu'il est préférable, du point de vue pratique, de distinguer des genres séparés suivant les deux types de ciliature.

Les *bacilles péritriches* rencontrés au cours de ce travail sont peu nombreux : 13 souches seulement et dont plusieurs attaquent xylose ou arabinose. Ils sont, dit Leifson [16], moins communs que la plupart des bactériologistes ne le pensent. Buttiaux et Gagnon [4] n'en ont pas trouvé malgré de nombreux examens portant surtout, il est vrai, sur des produits du milieu extérieur ; Moore et Pickett [20] en ont trouvé 6 sur 40 souches étudiées. Quelque rares qu'ils puissent être, c'est parmi eux qu'il faut chercher les membres du genre *Alcaligenes* puisque Petruschky, dans la description originale de l'espèce-type, a nettement défini le système ciliaire, semblable à celui du bacille typhique.

Il a moins bien précisé les autres caractères et seules la tradition et les émendations successives, notamment celles de Conn, de Breed, de Leifson permettent de choisir parmi les types biochimiques divers (tableau I) ceux qui correspondent à *A. faecalis*.

Petruschky avait cependant noté l'absence de pouvoir protéolytique ; mais ce caractère est commun aux 13 souches étudiées. Il en est de même de la présence d'une oxydase et d'une cytochrome-oxydase, signalée par Gaby [31], puis par Ewing et Johnson (1960 [33]). Les 6 souches complètement inactives sur les glucides qui ne réduisent pas le nitrate ou qui le réduisent en nitrite, peuvent être regardées comme biotypes d'*A. faecalis* ; les 3 souches qui réduisent le nitrate en azote moléculaire et cultivent en anaérobiose, en présence de nitrate, correspondent à l'espèce *A. denitrificans* décrite par Leifson et Hugh [17]. Toutes les autres souches possèdent un certain pouvoir glucidolytique ; les 3 qui réduisent le nitrate en azote moléculaire, oxydent lentement les pentoses et sont capables de cultiver sur milieu minéral glucosé, doivent être rejetées du genre *Alcaligenes* et rapprochées peut-être, suivant la suggestion de Conn, des *Rhizobiaceae*. La position d'une souche, inactive sur le nitrate, possédant les caractères classiques d'*A. faecalis*, mais qui oxyde lentement l'arabinose, est très troublante. On doit se demander si l'attaque tardive et faible de ce glucide suffit pour décider l'exclusion du genre. Nyberg [10] et Turck [41] admettaient la possibilité de variations spontanées du pouvoir glucidolytique ; même en supposant sa fixité, il faut s'attendre à des divergences suivant l'expérimentateur, les méthodes, le nombre et la nature des glucides, la durée d'observation, etc. Si l'oxydation d'un glucide marque la limite entre deux genres, il faut reconnaître qu'elle est bien fragile. La proposition de Brisou et Prévot [5] est tout à fait séduisante de supprimer le genre *Alcaligenes* et de regrouper dans le genre *Achromobacter* ses différentes espèces, dont beaucoup sans doute devraient disparaître.

De nombreux auteurs seraient favorables à cette fusion, semble-t-il, lorsqu'on lit, par exemple, les publications de Leifson (1960 [46]), de Buttiaux (1961). Malheureusement ni l'un, ni l'autre, ni Prévot (1957 [40]) ne donnent la même définition du genre *Achromobacter*. Il faudrait, qu'après étude approfondie de nombreuses souches, intervienne un accord international et que soit choisie une espèce-type dont l'existence soit indiscutable. De l'aveu même de Breed dans le *Bergey's Manual* [3], l'espèce *A. liquefaciens* désignée par Bergey en 1923 n'a jamais été retrouvée.

Les bacilles à ciliature polaire, non gélatinolytiques, ont en commun avec les bacilles pérित्रiches la présence d'une oxydase, l'absence de lysine-décarboxylase ; les autres caractères biochi-

miques observés ne permettent pas de les distinguer avec certitude du bacille pérित्रиче de Petruschky. Des études sur l'utilisation des acides aminés, telles que celles qui ont été entreprises par Denault, Cleverdon et Kulp (1953 [24]), celles sur le catabolisme de l'arginine par Sherris et Shoesmith (1959 [41]) pourront peut-être confirmer ou infirmer la validité d'une distinction qui repose à l'heure actuelle sur la seule morphologie.

La ciliature polaire des bacilles non protéolytiques revêt des aspects très divers. Pour la moitié des souches, la structure prédominante est lophotrichе et rappelle celle décrite par Galarneault et Leifson [48] pour le genre *Lophomonas* qu'ils ont proposé : une touffe de deux à quatre cils à l'un des pôles, parfois aux deux, cils relativement courts, à grande longueur d'onde et qui décrivent rarement une onde complète. Malheureusement, aucune de ces souches, pas plus que celles observées par Moore et Pickett [20], n'a l'ensemble des caractères biochimiques de *L. alcaligenes* ; aucune notamment ne produit de l' SH_2 en quantité appréciable, aucune ne cultive en anaérobiose, en présence de nitrate, une seule attaque le glycérol. Les autres bacilles sont à prédominance monotrichе, avec un cil relativement long, décrivant des courbes multiples ; ils correspondent sans doute à ce que Leifson [15] nomme *Ps. alcaligenes*. Les distinctions qui reposent sur le nombre de cils, leur degré de courbure, sont en pratique cependant très difficiles à apprécier, d'autant plus que dans la plupart des cultures, comme l'ont observé Rhodes [29] et Butiaux [4], on trouve un mélange de cellules monotriches, lophotriches, multitriches. En outre, les 16 souches étudiées, quel que soit l'aspect prédominant des cils, forment un ensemble biochimique homogène. Ces bacilles présentent fréquemment une incurvation du corps microbien, incurvation surtout marquée chez les lophotriches et au moment de leur isolement. Cet aspect les fait souvent nommer *Vibrio alcaligenes* ; cette appellation, due à Lehmann et Neumann [8] et sujette à bien des critiques, correspond à une attitude d'attente en attendant que soit clairement défini le genre *Vibrio* lui-même.

Les 24 souches protéolytiques rencontrées dont les caractères physiologiques peuvent prêter à confusion avec des germes du genre *Alcaligenes* sont toutes composées de bacilles à ciliature polaire généralement multitrichе. Leur pouvoir gélatinolytique énergétique, l'absence d'oxydase, la présence de lysine-décarboxylase, donnent à ce groupe une unité que la variabilité de quelques autres propriétés ne suffit pas à rompre. Six souches oxydent uniquement le maltose en trois à seize jours ; elles semblent répondre à la description donnée récemment par Hugh et Ryschenkow (1960 [21]) de *Pseudomonas maltophilia* ; la production de SH_2 , presque constante, ne concorde pas avec leurs observations

mais leur note, fort brève, ne comporte pas l'exposé des techniques ; il est difficile d'établir dans ces conditions une stricte comparaison. L'attaque d'un disaccharide sans attaque apparente du glucose est un phénomène rare qui a été cependant déjà signalé pour des bactéries d'autres groupes (Pelczar et Doetsch, 1949 [42]). Le nom d'espèce choisi est évocateur et pourrait s'appliquer aussi aux 13 souches qui oxydent secondairement le glucose ; il serait plus difficile de l'étendre à celles qui sont inactives vis-à-vis des glucides ou qui attaquent le seul glucose. Le nom de genre paraît s'appuyer surtout sur l'insertion polaire des cils et le mécanisme oxydatif du métabolisme glucidique ; ces critères semblent insuffisants pour rattacher aux *Pseudomonas* des bactéries sans pigment diffusible caractérisé, sans oxydase, dont Hugh ne mentionne pas l'absence, et enfin pourvues d'une lysine-décarboxylase dont l'existence n'a pas encore été signalée dans le genre.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

L'étude de 53 souches de bacilles mobiles présentant des caractères qui évoquent le genre *Alcaligenes* ne permet pas de tirer des conclusions étendues. Le fait de n'avoir pas retrouvé certaines espèces et, en particulier, aucune espèce protéolytique péritriche, ne permet pas de nier leur existence. Les espèces immobiles ont été systématiquement négligées pour limiter le sujet et parce que la plupart d'entre elles peuvent être rapprochées du genre *Moraxella* qui fait l'objet d'un autre rapport (M. Piéchaud [43]).

Toutes les bactéries *non protéolytiques* étudiées possédaient une oxydase et étaient dépourvues de lysine-décarboxylase. Seules la morphologie des bacilles et la disposition des cils ont permis de les diviser en deux groupes : l'un péritriche, l'autre à ciliature polaire. Il est souhaitable que l'introduction de tests biochimiques nouveaux confirme la légitimité de cette distinction.

Parmi 13 souches non protéolytiques, péritriches, 6 sont considérées comme *A. faecalis*, 3 comme *A. denitrificans*, les autres comme appartenant à un autre genre. On pourrait envisager l'inclusion des espèces du genre *Alcaligenes* dans le genre *Achromobacter*, mais il faudrait au préalable une définition du genre *Achromobacter* appuyée sur la désignation d'une nouvelle espèce-type.

Seize souches, non protéolytiques, à ciliature polaire, les unes lophotriches, les autres monotriches, n'ont pu être distinguées biochimiquement. L'appellation *Vibrio alcaligenes*, probablement impropre mais souvent utilisée depuis Lehmann et Neumann, a l'avantage d'être comprise par tous en attendant une connaissance plus approfondie des germes, peut-être disparates, qu'elle englobe.

Vingt-quatre souches de *bacilles protéolytiques* se sont toutes

révélaient multitriches ; elles étaient dépourvues d'oxydase et possédaient une lysine-décarboxylase. Cet ensemble de caractères donnait au groupe une certaine homogénéité. Six souches qui attaquaient exclusivement le maltose, semblaient répondre à la définition de *Ps. maltophilia* ; la plupart des autres en différaient par l'attaque secondaire du glucose. L'inclusion de ces bactéries dans le genre *Pseudomonas* ne paraît pas s'imposer.

Des caractères, tels que l'aérobiose stricte et la propriété d'alcaliniser les milieux glucosés, sont communs à tous les bacilles étudiés dans ce travail. Ils peuvent faire illusion sur leurs relations véritables. Les épreuves biochimiques usuelles sont insuffisantes pour les caractériser. Des recherches nouvelles sont indispensables pour les individualiser et leur attribuer une place logique dans la systématique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PETRUSCHKY (J.). *Zbl. Bakt.*, 1896, **19**, 187.
- [2] CASTELLANI (A.) et CHALMERS (A. J.). *Manual of tropical Medicine*, 3^e édit., 1919.
- [3] BREED (R. S.), MURRAY (E. G. D.) et SMITH (N. R.). In *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 7^e édit., 1957.
- [4] BUTTIAUX (R.) et GAGNON (P.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958, **40**, 119.
- [5] BRISOU (J.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 722.
- [6] BERGHAUS. *Hyg. Rundschau*, 1905, **15**, 1185.
- [7] KLIMENKO (W. N.). *Centralbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 1907, **43**, 755.
- [8] LEHMANN (K.) et NEUMANN (R.). *Bakt. Diag.* 7^e édit., 1927, **2**, 548.
- [9] RYTI (E.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1930, **115**, 177.
- [10] NYBERG (C.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1935, **133**, 443.
- [11] TURCK (L.). *Z. Hyg.*, 1952, **134**, 300.
- [12] CONN (H. J.), WOLFE (G.) et FORD (M.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 207.
- [13] CONN (H. J.). *J. Bact.*, 1942, **44**, 353.
- [14] HUGH (R.) et LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 24.
- [15] LEIFSON (E.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1958, **173**, 487.
- [16] LEIFSON (E.). *Atlas of bacterial flagellation*. Academic Press, 1960.
- [17] LEIFSON (E.) et HUGH (R.). *J. gen. Microb.*, 1954, **11**, 512.
- [18] GALARNEAULT (T. P.) et LEIFSON (E.). *Canad. J. Microb.*, 1956, **2**, 102.
- [19] SARKAR (J. K.), CHOUDHURY (B.) et TRIBEDI. *Ind. J. med. Res.*, 1959, **47**, 1.
- [20] MOORE (H. B.) et PICKETT (M. J.). *Canad. J. Microb.*, 1960, **6**, 43.
- [21] HUGH (R.) et RYSCHENKOW (E.). *Bact. Proc.*, 1960, 78.
- [22] BRAUN (H.) et CAHN-BRONNER (C. E.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1921, **86**, 196.
- [23] BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (C.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 980.
- [24] DENAULT (L. J.), CLEVERDON (R. C.) et KULP (W. L.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 465.
- [25] VÉRON (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 16.

- [26] KING (E. O.), WARD (M.). et RANCY (D. E.). *J. Laborat. clin. Med.*, 1954, **54**, 301.
 - [27] THIBAUT (P.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 551.
 - [28] LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 377.
 - [29] RHODES (M. E.). *J. gen. Microb.*, 1958, **18**, 639.
 - [30] KOVACS (N.). *Nature*, 1956, **178**, 703.
 - [31] GABY (W. L.) et HADLEY (C.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 356.
 - [32] VÉRON (M.) et CHATELAIN (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 253.
 - [33] EWING (W. H.) et JOHNSON (J. G.). *Intern. Bull. Bact. Nom. and Taxon.*, 1960, **10**, 223.
 - [34] LEIFSON (E.) et HUGH (R.). *J. Bact.*, 1953, **65**, 263.
 - [35] SNEATH (P. H. A.). *J. gen. Microb.*, 1956, **15**, 99.
 - [36] LEIFSON (E.). *J. Bact.*, 1956, **71**, 393.
 - [37] BUTTIAUX (R.) et VOISIN (C.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-1959, **40**, 151.
 - [38] LEIFSON (E.) et HUGH (R.). *J. Bact.*, 1953, **65**, 263.
 - [39] BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 43.
 - [40] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*. Masson et C^{ie}, Paris, 3^e édit., 1957.
 - [41] SHERRIS (J. C.) et SHOESMITH (J. G.). *J. gen. Microb.* 1959, **21**, 289.
 - [42] PELCZAR (M. J.) et DOETSCH (R. N.). *Science*, 1949, **110**, 256.
 - [43] PIÉCHAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 74.
-

LE GROUPE MORAXELLA. A PROPOS DES B5W-BACTERIUM ANITRATUM

par M. PIÉCHAUD.

(Institut Pasteur, Service de Microbie générale)

Dans les années qui suivirent la dernière guerre mondiale, furent décrits aux Etats-Unis, presque en même temps, sous le nom de B5W par Stuart, Formal et Mc Gann [26], et de *Bact. anitratum* par Schaub et Hauber [24], des bactéries qui semblaient encore inconnues. Des échanges de souches avaient d'ailleurs montré l'identité de ces deux germes que confirmaient Ferguson et Roberts [9]. Une étude de Brooke [5], au Danemark, prouvait aussi leur fréquence en Europe.

Les caractères principaux d'identification étaient : bacilles souvent par paire, assez courts pour être confondus avec des *Neisseria*, immobiles, pourvus d'une capsule mince, Gram négatifs, se décolorant lentement, non sporulés.

Réaction des oxydases négative. Aérobie stricts, cultivant sur milieux ordinaires.

Indole, SH_2 , acétyl-méthyl-carbinol non produits.

Nitrates non réduits en nitrites.

Cultures sur milieu au citrate de Simmons.

R.M. irrégulièrement positif, uréase non produite en général, gélatine non liquéfiée ou liquéfiée très lentement, lait lentement acidifié et coagulé.

Glucose, galactose, xylose, arabinose, acidifiés ; rhamnose irrégulièrement acidifié.

Lactose à 10 p. 100 (technique de Chilton et Fulton, 1946), acidifié en moins de vingt-quatre heures, tandis que le lactose à 1 p. 100 ne l'était que rarement et lentement.

A part de rares exceptions, ils se montraient pénicillino-résistants.

Du point de vue antigénique, si Schaub et Hauber ne trouvaient qu'un seul type capsulaire, Ferguson et Roberts en déterminaient plus de dix.

Schaub et Hauber avaient insisté sur l'aérobiose stricte et la non-réduction des nitrates qui éliminaient ces germes du groupe des Entérobactériacées et justifiaient le nom provisoire de *Bacterium anitratum*.

Un autre bactériologiste américain, De Bord, étudiant de 1939 à 1942 des bacilles Gram négatifs pouvant être confondus avec des *Neisseria* sur des frottis d'urétrite, proposait une tribu des *Mimeae* [3] comprenant le genre *Mima*, espèce-type *Mima polymorpha* (oxydase —) et sa variété *oxydans* (oxydase +) n'acidifiant pas de glucides, un genre *Herella*, espèce-type *Herellea vaginicola*, acidifiant des sucres sans gaz, et un genre *Colloides*, espèce-type *Colloides anoxydans*, acidifiant des sucres avec gaz.

Deacon [7], en 1945, avait identifié diverses souches comme *Mima*, *Herellea* et *Colloides*. Retenons cependant qu'en ce qui concerne les fermentations sucrées, il notait l'absence de concordance entre ses *Herellea* et celles de De Bord qui acidifient mannitol et dulcitol, ce que ne faisaient pas les siennes. En 1949, Ewing [8] compara quelques-unes des souches de *Herellea* de Deacon avec *Bacterium anitratum* et conclut à l'identité de ces germes.

De notre côté, à partir de 1948, avec D. Piéchaud et L. Second, nous commençons à réunir des souches présentant des caractères morphologiques et culturels communs ; mais il se trouve que certaines acidifient le glucose, les autres non. Frappés par l'aspect diplobacillaire de ces germes, nous les comparons avec les *Moraxella lwoffii* décrites par Alice Audureau [4] en 1940 et conservées dans la collection de l'Institut Pasteur. Les souches glucose — sont bien des *M. lwoffii*. Quant aux souches glucose +, elles sont identiques à deux B5W (A 267 et R222) dus à l'obligeance du Dr Stuart. Elles correspondent à *Bacterium anitratum*, ainsi que la description très explicite de Schaub et Hauber le montre. D'ailleurs, Ferguson et Roberts ont déjà établi que B5W et *Bact. anitratum* sont un seul et même germe. Mais elles sont si proches de *M. lwoffii* par tout un ensemble de caractères morphologiques et culturels que nous proposons en 1951 de les considérer comme une variété, *M. lwoffii* var. *glucidolytica* (Piéchaud, Piéchaud et Second [20]).

En 1956, nous décrivons des souches se différenciant des précédentes seulement par leur pouvoir protéolytique et attaquant rapidement le sérum coagulé, la gélatine et la caséine, sous le nom de *M. lwoffii* var. *liquefaciens* et de *M. glucidolytica* var. *liquefaciens* (Piéchaud, Piéchaud et Second [21]).

Le genre *Moraxella* a été créé par Lwoff [15] en 1939 pour réunir des diplobacilles dont l'espèce-type avait été décrite en

1896 par V. Morax [17] et les séparer des *Hemophileae* qui n'ont aucun rapport morphologique ou métabolique avec eux. A la suite de l'étude d'ensemble du genre par Alice Audureau [4] qui décrit en 1940 une nouvelle variété et une nouvelle espèce de *Moraxella*, nos propres observations nous ont conduit à une conception résumée dans le tableau suivant, toutes ces bactéries étant aérobies strictes, indole —, SH_2 —, catalase +.

Groupe I : Test des oxydases + ; nitrites + ; sensible à la pénicilline.

M. lacunata : sérophile :

var. *typica* : protéolytique ;

var. *atypica* : non protéolytique.

M. duplex :

var. *liquefaciens* : protéolytique ;

var. *non liquefaciens* : non protéolytique.

M. bovis ? (ou *duplex*, variété *bovis*) : protéolytique.

Groupe II : Test des oxydases — ; nitrites — ; résistant à la pénicilline ; poussant en milieu synthétique simple avec de l'alcool éthylique comme source de carbone.

M. lwoffii :

var. *liquefaciens* : protéolytique ;

var. *non liquefaciens* : non protéolytique.

M. glucidolytica :

var. *liquefaciens* : protéolytique ;

var. *non liquefaciens* : non protéolytique.

M. lacunata, var. *typica* : bacille de Morax-Axenfeld.

M. lacunata, var. *atypica* (Audureau, 1940). Nous pensons avoir retrouvé ce germe, qui n'avait pas été gardé en collection, dans une souche décrite sous le nom de « *Moraxella polymorpha* », par Flamm [10], 1957, et dans quelques autres étudiées dans notre laboratoire.

M. duplex, var. *liquefaciens* : bacille de Petit (1900).

M. duplex, var. *non liquefaciens* : *B. non liquefaciens* de Scarlett (1916).

M. bovis : Jones et Little (1923). Il est possible que ce germe soit distinct de l'espèce *duplex* et comporte même une variété *non liquefaciens*.

M. lwoffii : A. Audureau (1940) distingue cette espèce de diplobacille par sa faculté de pousser en milieu synthétique simple avec un sel d'ammonium comme source d'azote et de l'alcool éthylique comme source de carbone.

ETUDE MORPHOLOGIQUE.

La morphologie a toujours été et doit rester le premier critère de classification. Elle est ici très importante, les *Moraxella* ayant un ensemble de caractères de groupe sur lequel s'appuie en pratique le diagnostic d'orientation et justifiant la réunion de ces espèces et variétés. Ce sont des bactéries toujours immobiles, non ciliées, non sporulées, dont le diamètre moyen, en fait extraordinairement variable, se situe autour de 1 μ . Elles sont souvent capsulées. La capsule, mince en général, est visible à l'état frais dans l'encre de Chine ou par coloration, mais il existe des variantes muqueuses possédant une épaisse capsule (pl.). Gram négatives, elles se décolorent lentement et peuvent être considérées comme Gram variables. Certaines souches sont même

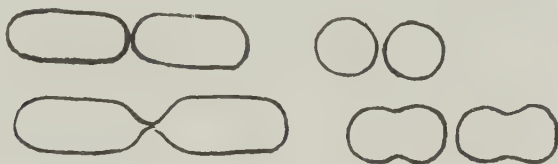


FIG. 1.

Gram positives à l'isolement. Les extrémités sont nettement arrondies. Toutes les espèces ont un groupement caractéristique en *diplobacille* associant par paire deux bacilles de taille égale, tantôt beaucoup plus longs que larges, nettement bacillaires, tantôt si courts qu'ils en arrivent à simuler des coques, d'où la confusion possible avec des *Neisseria* (fig. 1). Mais la division se fait par étranglement dans une seule direction ; il n'y a donc jamais de groupement par trois ou en tétrade. La préparation à la division donne un aspect typique (fig. 1) déjà visible sur la photographie de culture publiée en 1896 par V. Morax. On trouve aussi des chainettes, des filaments, portant parfois des renflements ovoïdes. C'est le polymorphisme souvent signalé. Mais, Henriksen [41] remarque qu'une souche polymorphe à 37° reprend un aspect normal lorsqu'on la cultive à une température inférieure. Nous avons bien souvent observé le même fait. Ce polymorphisme peut exister dans un produit pathologique (pl.). Il existe de façon à peu près constante des corpuscules métachromatiques ronds, relativement gros, visibles en contraste de phase, et colorables soit par le bleu Borrel, suivi d'une décoloration ménagée par l'alcool absolu (ils ont alors une teinte métachromatique violet pourpre), soit par une coloration d'Albert

modifiée, faite de la façon suivante : Fixer à l'état humide aux vapeurs d'acide osmique, sécher et monter sous lamelle dans :

Bleu de toluidine	0,15 g
Vert de méthyle	0,02 g
Acide acétique cristallisé	1 ml
Alcool éthylique à 95°	2 ml
Eau distillée	100 ml

Eponger immédiatement et luter à la paraffine. Les corpuscules contrastent en violet pourpre sur un cytoplasme gris-bleu pâle. Uniques habituellement dans les formes courtes, ils peuvent être nombreux dans les formes longues (fig. 2). Il faut savoir qu'ils

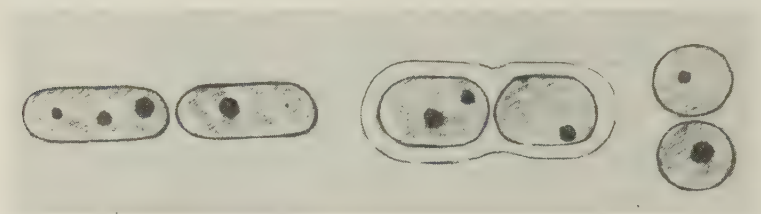


FIG. 2.

apparaissent comme des granules violet-noir sur un Gram dont la décoloration n'est pas trop poussée, ou comme des vacuoles claires lorsqu'ils sont décolorés et de grande taille. D'apparition précoce, ils existent en fin de croissance ; on les trouve aussi bien sur gélose et en bouillon que sur sérum coagulé (pl.).

STRUCTURE NUCLÉAIRE.

Des cellules jeunes en division active peuvent être obtenues sur gélose ordinaire ou gélose-sérum. Mais la méthode la plus expéditive consiste à mettre une colonie en suspension dans quelques millilitres de bouillon agité au bain-marie à 35° ; on obtient ainsi en deux à six heures une culture en phase exponentielle.

Après fixation par les vapeurs osmiques, puis l'alcool méthylique et coloration directe par l'éosinate d'azur de méthylène (Picchaud [22]) ou par la méthode de Pickarski-Robinow, les préparations sont montées dans un surnageant de colorant. Ce qui frappe de prime abord, c'est le volume des corps nucléaires qui occupent une grande partie des cellules, et reproduisent à eux seuls la forme générale du diplobacille. Le cytoplasme est disposé autour en couche mince. La chromatine nucléaire, formant un réticulum plus ou moins grossier selon les souches, est sou-

vent condensée en granules à la périphérie du noyau qui prend alors un aspect de vésicule (mais on ne peut affirmer qu'il ne s'agit pas là d'un effet d'optique). La division paraît se faire par une sorte de cassure dans cette masse, suivie d'un étranglement, ou directement par un étranglement d'allure amitotique sans remaniement notable, suivie de très près ou accompagnée par la division cellulaire (fig. 3 et pl.).

Dans les formes âgées la chromatine est condensée en granules

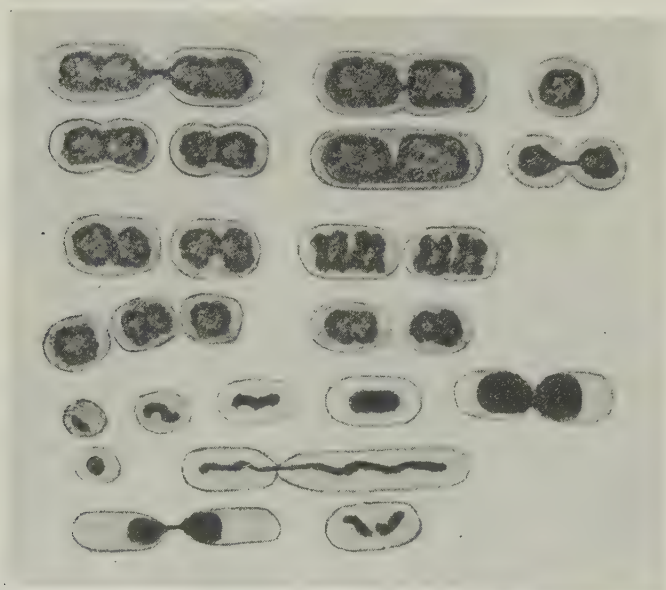


FIG. 3.

dans les formes courtes, ou filaments dans les formes longues, très colorables et de disposition variée (fig. 3 et pl.).

Nous avons trouvé cette morphologie chez *M. lwoffii* et chez *M. glucidolytica* (Piéchaud, Piéchaud et Second [20]), chez leurs variétés *liquefaciens* [21], de même que chez toutes les autres espèces de *Moraxella* (Piéchaud [23]). Les observations de Murray et Truant [18] sont analogues, la seule discordance portant sur les corpuscules métachromatiques, rares pour eux (mais leur technique de coloration de ces inclusions est différente).

L'aspect nucléaire s'est ajouté aux autres caractères morphologiques par suite des progrès de la cytologie. Il est appelé à prendre une grande importance à mesure que progresseront nos

connaissances pour établir les raisons de grouper, de séparer des espèces, de changer leur place dans la classification. Que *M. lwoffii* et *M. glucidolytica* aient de telles analogies de structure avec les autres espèces du genre, justifierait en soi à nos yeux le rapprochement en dehors d'une ressemblance par les caractères de culture. Elles sont très différentes, par leur morphologie nucléaire, des Entérobactériacés (fig. 4 a) ou d'*Alcaligenes* mobiles (fig. 4 b) ou immobiles et courts (fig. 4 c). Elles se distinguent aussi formellement des *Neisseria* dont les noyaux ronds

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — *M. duplex*, var. *non liquefaciens* : souche muqueuse isolée d'un pus de dilatation des bronches. Frottis à l'encre de Chine d'une culture sur gélose. D. $\times 1\ 500$.

FIG. 2. — *M. lwoffii*, var. *non liquefaciens* : capsule muqueuse. Etat frais dans l'encre de Chine. Contraste de phase. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 3. — *M. glucidolytica*, var. *non liquefaciens* : capsule normale. Etat frais dans l'encre de Chine. Contraste de phase. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 4. — *M. duplex*, var. *non liquefaciens* : souche muqueuse. Frottis de pus bronchique. Coloration de Gram. D. $\times 1\ 150$.

FIG. 5. — Même préparation que figure 4, même grossissement. Autre champ, avec grosses formes longues.

FIG. 6. — *M. lwoffii*, var. *non liquefaciens* : culture sur sérum coagulé ; corpuscules métachromatiques. Préparation fixée et montée dans le colorant d'Albert. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 7. — *M. duplex*, var. *non liquefaciens* : culture sur gélose nutritive ; corpuscules métachromatiques. Même coloration que figure 6. D. $\times 6\ 000$.

FIG. 8. — *M. duplex*, var. *liquefaciens* : corpuscules métachromatiques. Coloration au bleu Borrel. D. $\times 3\ 000$.

Clichés 9 à 17 : colorations nucléaires directes sans hydrolyse, à l'éosinate d'azur. Les préparations des figures 12, 13 et 14 ont été pressées au moment du montage pour étaler les structures nucléaires.

FIG. 9. — *M. glucidolytica*, var. *liquefaciens* : culture exponentielle. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 10. — *M. lwoffii*, var. *non liquefaciens* : culture exponentielle. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 11. — *M. duplex*, var. *non liquefaciens* : culture exponentielle. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 12. — *M. lwoffii*, var. *non liquefaciens* : culture exponentielle. D. $\times 4\ 600$.

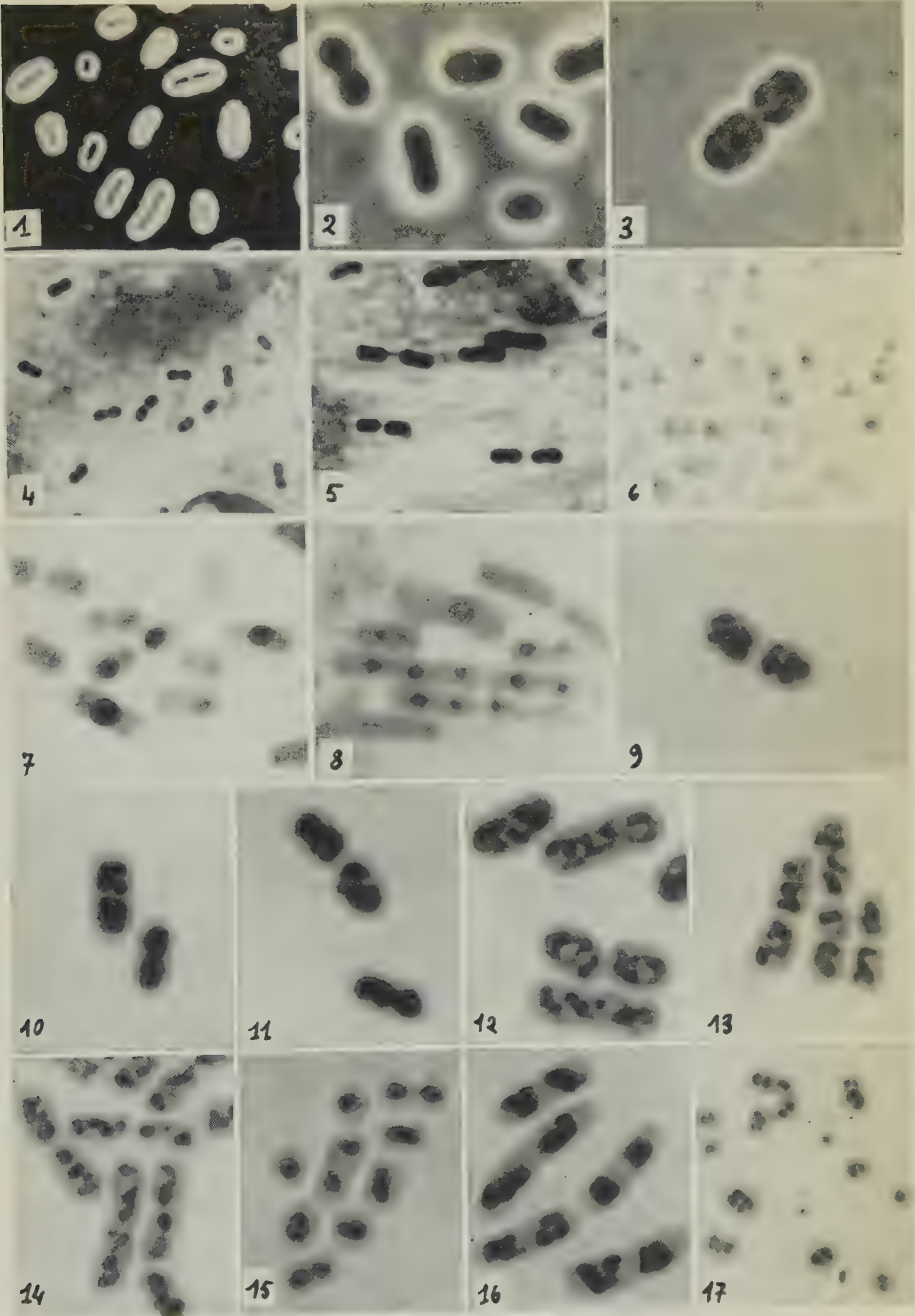
FIG. 13. — *M. duplex*, var. *non liquefaciens* : culture exponentielle. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 14. — *M. duplex*, var. *liquefaciens* : culture exponentielle. D. $\times 4\ 600$

FIG. 15. — *M. lwoffii*, var. *non liquefaciens* : formes de repos. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 16. — *E. coli* : culture exponentielle. D. $\times 4\ 600$.

FIG. 17. — *Neisseria sicca* : culture sur gélose. D. $\times 1\ 400$.



ou ovoïdes se divisent selon des directions successivement perpendiculaires, d'où les groupements par trois ou par quatre (fig. 4 d et pl.).

Jusqu'à présent, nous n'avons pas rencontré de bactéries pouvant prêter à confusion avec elles, et présentant ces éléments morphologiques.

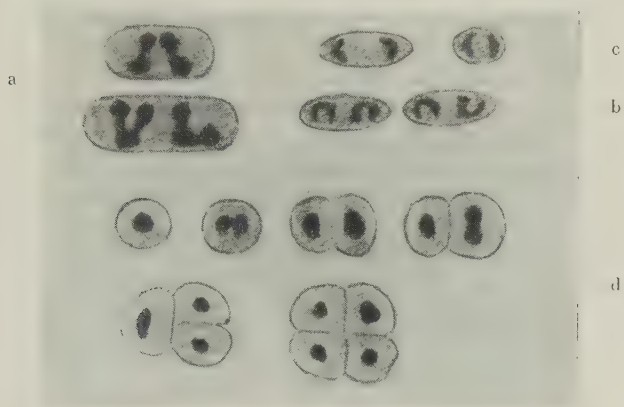


FIG. 4.

COMPARAISON ENTRE LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DU GROUPE II (tableau) PAR LES AUTRES CARACTÈRES.

Bouillon : trouble finement floconneux, ondes, collerette ou voile. L'intensité du trouble en dix-huit à vingt-quatre heures dépend des souches. *M. lwoffii* et les deux variétés *liquefaciens* donnent un trouble moins intense en vingt-quatre heures que *M. glucidolytica*.

Gélose inclinée : colonies de 1 mm à 2,5 mm de diamètre, présentant une irisation dorée en éclairage par transmission oblique. Dissociation en colonies bleutées ou muqueuses. *M. lwoffii* et les deux variétés *liquefaciens* donnent des colonies plus petites en vingt-quatre heures que *M. glucidolytica*.

Gélose profonde : colonies sur 0,5 cm environ à partir de la surface, pas de culture en profondeur, même s'il y a du nitrate dans le milieu.

Acidification des glucides : doit être recherchée sur gélose inclinée de préférence à l'eau peptonée. *M. glucidolytica* et sa variété *liquefaciens* acidifient les milieux additionnés de glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose à 1 p. 100 et lactose à

10 p. 100 en un jour d'une façon constante. Le type fermentaire est oxydatif pur.

Nous avons pu observer les mêmes acidifications par *M. lwoffii* (en particulier *M. lwoffii* var. *bacteroides* d'Audureau) en diluant le milieu au tiers ou au quart avec une solution minérale gélosée.

Utilisation du citrate (milieu de Simmons) : directe par *M. glucidolytica*, habituellement mutative par les variétés *liquefaciens*. Des mutants citrate positifs ont été obtenus à partir de *M. lwoffii* (en particulier la souche *bacteroides* d'Audureau).

Cultures en milieu synthétique de base : toutes poussent abondamment avec de l'alcool éthylique comme source de carbone.

Des relations antigéniques existent entre toutes ces souches, selon nos propres observations (Piéchaud, Piéchaud et Second [20, 21]) et celles de Cary et coll. [6] sous le nom de *M. polymorpha* et *Bact. anitratum*.

La parenté étroite de ces germes est évidente. Les souches protéolytiques doivent être considérées comme de simples variétés.

COMPARAISON AVEC LES *Moraxella* DU GROUPE I (voir tableau).

M. lacunata a les défauts des espèces-types, surtout quand elles sont pathogènes, et serait à elle seule un mauvais terme de comparaison. C'est la seule espèce vraiment sérophile, la seule délicate à cultiver, donnant des colonies en goutte de rosée en vingt-quatre heures, qui restent transparentes ensuite. En 1947, Lwoff [16] a montré que cette « sérophilie » était tout simplement une plus grande sensibilité à des substances toxiques qui peuvent être neutralisées par adjonction d'une faible quantité de sérum ou d'ascite. Un bouillon inapte à la culture le devient si on le dilue de moitié ou encore si l'inoculum est abondant.

On trouve tous les degrés de sérophilie chez diverses espèces de *Moraxella*, selon la souche et aussi la qualité du milieu, et se traduisant par un moins grand nombre de colonies que sur milieu adéquat pour le même nombre de germes ensemencés, la croissance en colonies de taille irrégulière, la croissance en gélose profonde sans sérum sous forme d'un disque suspendu de colonies dans les limites de la zone d'aérobiose, mais sans culture en surface (tandis qu'avec sérum, les colonies apparaissent aussi en surface). Nous avons observé ces aspects avec quelques souches de *M. duplex non liquefaciens* et de *M. lwoffii*.

Comme les espèces du deuxième groupe, les *Moraxella* de ce groupe ont une préférence générale pour une température d'incubation inférieure à 37° et pour les milieux alcalins.

Les cultures en bouillon ont le même aspect finement floconneux avec onde par agitation et formation possible d'une colle-rette ou d'un voile.

Les colonies sont irisées, une dissociation en colonies bleues existe, ainsi que des colonies muqueuses. Leur taille, en dix-huit à vingt-quatre heures, varie selon les souches et atteint 2 mm chez *M. duplex non liquefaciens*.

Le caractère d'aérobiose reste strict, même en présence de nitrate.

Les capacités biochimiques sont aussi réduites.

Le seul caractère, à première vue fondamentalement différent, est le test des oxydases. Pour Henriksen [12, 13], seules les souches oxydase positives sont des *Moraxella*. Mais cet auteur a trouvé des souches donnant une réaction faible. Peut-on attribuer une valeur absolue à un test unique, positif chez des bactéries très diverses et dont la négativité s'expliquerait par le pouvoir réducteur plus grand de germes qui ont sans doute un système de cytochromes ?

Par-dessus ce test, la ressemblance entre *M. duplex* var. *non liquefaciens* et *M. lwoffii* est assez frappante pour que De Bord ait considéré la première comme une simple variété oxydase + (*oxydans*) de *Mima polymorpha*. L'opinion de Murray et Truant [18] sur ce point est semblable.

L'existence de souches intermédiaires par quelque caractère vient appuyer l'idée évolutionniste qu'on ne peut s'empêcher d'avoir quand on considère le genre, de *M. glucidolytica* aux aptitudes les plus grandes à *M. lacunata* la plus dégradée par son parasitisme.

Certaines *M. duplex non liquefaciens* cultivent en milieu synthétique à l'alcool éthylique (Henriksen [12] et nous-même en des observations non publiées).

Une souche de *M. lwoffii* typique par ses autres caractères, réduit les nitrates en nitrites.

Une souche de *M. duplex non liquefaciens*, poussant rapidement et abondamment en milieu synthétique de base, est citrate positive par mutation sur milieu de Simmons.

Le caractère de sensibilité à la pénicilline peut se trouver chez les souches du groupe II, tandis que *M. duplex non liquefaciens* est souvent moins sensible à cet antibiotique que les autres germes du groupe.

Une « sérophilie » relative existe chez quelques souches de *M. lwoffii*.

Le diagnostic positif d'une *Moraxella* a pour point de départ la morphologie telle que nous l'avons décrite. Le diagnostic diffé-

rentiel entre espèces et variétés doit se faire sur un ensemble de caractères.

Il y a donc tout lieu d'admettre les souches du deuxième groupe dans le genre.

Nous ne sommes pas isolé dans cette opinion.

Audureau a considéré *M. lwoffii brevis* comme une *Moraxella* même avant de connaître la souche *bacteroides* qui n'a fait que confirmer sa conviction. Henriksen [14] a décrit des diplobacilles dont certains oxydase négatifs. Il n'a pas fait de doute pour lui que ces germes étaient voisins des diplobacilles oxydase positifs.

De Bord [3] a classé comme *Mima polymorpha* (équivalant à *M. lwoffii*) des souches oxydase positives (var. *oxydans*) et oxydase négatives.

Deacon [7], Murray et Truant [18] ont retrouvé les mêmes souches ne semblant se différencier que par ce seul test.

Zur Nedden [28, 29], qui connaissait bien le bacille de Morax, a décrit en 1902-1904 un diplobacille qui pourrait correspondre à *M. glucidolytica* si l'on en croit quelques caractères rapportés par Oeding [19].

CONSIDÉRATIONS SUR QUELQUES NOMS ÉQUIVALENTS OU SUPPOSÉS ÉQUIVALENTS A CELUI DE *M. glucidolytica*.

Si B5W est une désignation de souche, *Bacterium anitratum* est un nom temporaire, le genre *Bacterium* étant destiné aux germes n'ayant pas encore de place dans la classification.

L'assimilation de *Bacterium anitratum* à *Herellea vaginicola* est loin d'être sûre, puisqu'il n'y a pas correspondance entre les acidifications de glucides indiquées par De Bord et celles trouvées par Deacon, et qu'une souche type d'*Herellea* n'existe pas. Dans le doute, c'est donc un nom à éviter.

La question du *Diplococcus mucosus*, considéré par Seeliger comme identique à *Bacterium anitratum* [25], a été éclairée par Véron, Thibault et Second [27]. Ce germe existe bien, a tous les caractères d'une *Neisseria* et doit donc être appelé *Neisseria mucosa* (nous l'avons retrouvé en 1960 dans un cas de méningite cérébro-spinale).

Rien ne justifie l'inclusion de *M. lwoffii*, de *M. glucidolytica* et de leurs variétés dans un genre *Acinetobacter* [4], groupe hétérogène (dont la plupart des espèces sont décrites comme anaérobies facultatives [2] : tels *Acinetobacter stenohalis*, *butyri*, *eurydice*, *delmarvae*, *marshalli*, *metalcaligenes*), avec d'ailleurs une absence de distinction abusive entre les protéolyses rapides et lentes de la gélatine.

CONCLUSION.

Nous espérons avoir montré les raisons de placer *M. lwoffii* et *M. glucidolytica* (B5W, *Bacterium anitratum*) dans le genre *Moraxella*, alors que, pour l'instant, aucun fait convaincant n'a été apporté à l'encontre de cette thèse. Les arguments tirés de la morphologie nous semblent particulièrement valables. Les arguments tirés des caractères de culture peuvent convaincre les bactériologistes ayant étudié de nombreuses souches variées de *Moraxella*, mais non ceux qui croient encore que ces germes sont des hémophiles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUDUREAU (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **64**, 126.
- [2] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7^e édit., Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1957.
- [3] DE BORD (G.). *Iowa State Coll. J. Sci.*, 1942, **16**, 471.
- [4] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 134.
- [5] BROOKE (M. S.). *Acta path. microb. scand.*, 1951, **28**, 338.
- [6] CARY (S. G.), LINDBERG (R. B.) et FABER (J. E.). *J. Bact.*, 1958, **75**, 43.
- [7] DEACON (W. E.). *J. Bact.*, 1945, **49**, 511.
- [8] EWING (W. H.). *J. Bact.*, 1949, **57**, 659.
- [9] FERGUSON (W. W.) et ROBERTS (L. F.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 171.
- [10] FLAMM (H.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1956, **66**, 498.
- [11] HENRIKSEN (S. D.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1958, **43**, 157.
- [12] HENRIKSEN (S. D.). *J. gen. Microbiol.*, 1952, **6**, 318.
- [13] HENRIKSEN (S. D.). *Intern. Bull. Bact. Nomen. Taxon.*, 1960, **10**, 231.
- [14] HENRIKSEN (S. D.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1947, **24**, 184.
- [15] LWOFF (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 168.
- [16] LWOFF (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 735.
- [17] MORAX (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1896, **10**, 337.
- [18] MURRAY (R. G. E.) et TRUANT (J. P.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 13.
- [19] OEDING (P.). *Acta Ophthalmol.*, 1946, **24**, 159.
- [20] PIÉCHAUD (D.), PIÉCHAUD (M.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 97.
- [21] PIÉCHAUD (D.), PIÉCHAUD (M.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 517.
- [22] PIÉCHAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 66 ; 1954, **86**, 787.
- [23] PIÉCHAUD (M.). VIII^e Congrès Intern. Botanique, Paris, 1954.
- [24] SCHAUB (I. G.) et HAUBER (F. D.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 379.
- [25] SEELIGER (H.). *Zbl. Bakt., I, Orig.*, 1953, **159**, 173.
- [26] STUART (C. A.), FORMAL (S.) et Mc GANN (V.). *J. inf. Dis.*, 1949, **84**, 235.
- [27] VERON (M.), THIBAUT (P.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 497.
- [28] ZUR NEDDEN. *Arch. Ophthalmol.*, 1902, **54**, 1.
- [29] ZUR NEDDEN. *Arch. Ophthalmol.*, 1904, **59**, 360.

ÉTUDE ANTIGÉNIQUE DES *ACHROMOBACTEREAE*

par J. BRISOU

(avec la collaboration technique de H. JARRIAULT et B. MOULIN).

(Ecole de Médecine de Poitiers)

INTRODUCTION.

Les bactériologues ont à l'heure actuelle le choix entre plusieurs systématiques. Aucune ne peut prétendre à plus de vérité qu'une autre ou se prévaloir de qualités qui puissent emporter d'emblée la conviction.

Le problème que l'on aborde aujourd'hui ne peut être compris que si l'on précise la position taxinomique des bactéries étudiées. Nous savons en effet que, dans l'état actuel des choses, les *Achromobacter* des uns seront appelés *Pseudomonas* par d'autres ; que si les *Erwinia* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* dans certains manuels, d'autres les considèrent comme des *Pseudomonadaceae*. Autant de problèmes posés qui ne sont pas encore résolus. L'essentiel est de limiter le sujet et d'en tracer le cadre. Aucun fait nouveau ou décisif ne paraît justifier des infidélités à la systématique française de J. Magrou et A.-R. Prévot (1948), revue par Prévot en 1957. C'est donc elle que nous suivrons dans cette enquête sérologique [1, 2].

LES *Achromobacteriae*.

Les *Achromobacteriae* constituent une tribu au sein de la famille des *Pseudomonadaceae*. On y groupe des bactéries mobiles ou non, achromogènes, très cosmopolites, cultivant aisément sur les milieux usuels et les plus simples, et que l'on ne peut classer dans la famille des *Enterobacteriaceae*, quoique souvent très voisines.

Les facteurs adjuvants, les liquides biologiques sont inutiles à la croissance de ces microbes. Cette propriété essentielle permet de les séparer immédiatement des espèces sérophiles et des parasites obligatoires, telles que les classiques *Moraxella* admises par la majorité des taxinomistes.

Si l'on souligne la non-appartenance de ces germes à la famille des *Enterobacteriaceae*, c'est en raison de fréquentes similitudes qui prêtent parfois à confusion. Le diagnostic ne devient possible qu'en faisant appel à de nombreux tests biochimiques dépassant les techniques de routine et de laboratoire clinique, où l'on demande à juste titre des réponses et des orientations rapides.

Il en résulte qu'à l'isolement d'une bactérie à Gram négatif, cultivant aisément, aérobie préférentielle, on pense immédiatement et à bon droit à la possibilité d'une Entérobactérie. Si l'on ne peut en établir la preuve formelle, on est invité à envisager la possi-

TABLEAU I. — Sérums anti-*Achromobacter* et *Achromobacter*.

NOMS	NOMBRE	AGGLUTINATIONS	
		Mono- valentes	Poly- valentes
<i>Bookeri</i>	1	1	
<i>Delicatulum</i>	5	1	3
<i>Desidiosa</i>	1	1	
<i>Desmolyticum</i>	1		1
<i>Beaufortensis</i>	1	1	
<i>Fecaloides</i>	1		1
<i>Formosum</i>	2	1	1
<i>Hyperopicum</i>	1		1
<i>Ichthyodermis</i>	1		1
<i>Iophagum</i>	1		1
<i>Labrum</i>	1		
<i>Mephitica</i>	1		1
<i>Multistriatum</i>	1		
<i>Mira</i>	1		
<i>Pinnatum</i>	1	1	
<i>Pikowsky</i>	1		1
<i>Putrefaciens</i>	4	3	
<i>Pestifer</i>	1		1
<i>Recti</i>	1		1
<i>Stereotropis</i>	3		1
<i>Superficiale</i>	1		1
<i>Tralucida</i>	1		
<i>Ureasophorum</i>	2		1
<i>Venenosum</i>	3	1	1
TOTAL	37	10	17

En résumé : Agglutinées, 70 p. 100 ; monovalentes, 23,2 p. 100 ; polyvalentes, 46,8 p. 100. — Epreuves positives les plus fréquentes : 25 (*venenosum*), 22 (*delicatulum*), 28 (*hyophagum*), 29 (*pikowsky*), 30 (*recti*), 32 (*superficiale*).

bilité d'une *Pseudomonadaceae*, en particulier d'une *Achromobactereae*. Cette méthode a en sa faveur la commodité. Un microbe non glucidolytique ou sans action sur les nitrates est aisé à exclure de la famille des *Enterobacteriaceae*, il n'en va plus de même pour bien d'autres germes ; on multiplie alors les épreuves et l'on en vient aux techniques de sérologie. Notre exposé pour répondre à la demande exprimée sera limité à ce seul aspect du problème.

Il est bien certain que cette étude n'épuisera pas le sujet. On

TABLEAU II. — Sérums anti-*Achromobacter* et *Erwinia*.

NOMS	NOMBRE	AGGLUTINATIONS	
		Mono- valentes	Poly- valentes
<i>Salmonis</i>	1		1
<i>Ichthyosmia</i>	3	1	2
<i>Atroseptica</i>	2	1	1
<i>Carotovora</i>	5	2	3
<i>Phytophthora</i>	3	2	1
<i>Betivora</i>	4	2	1
<i>Amylovora</i>	2	1	
<i>Avoideae</i>	1		
<i>Carnegieana</i>	20	15	4
<i>Jugis</i>	1		
<i>Dissolvens</i>	3	3	
<i>Tracheiphila</i>	3		1
<i>Dahliae</i>	3	1	2
<i>Cacticida</i>	4	1	2
<i>Cytolytica</i>	1	1	
<i>Salicis</i>	2		1
<i>Nimipressuralis</i>	9	1	1
TOTAL	67	31	20

En résumé : Agglutinées, 73 p. 100 ; monovalentes, 44 p. 100 ; polyvalentes, 29 p. 100. — Sérums les plus souvent positifs : 5 (*bookeri*), 32 (*superficiale*), 33 (*venenosum*).

Presque toutes les souches d'*Erw. carnegieana* furent agglutinées par le sérum 32.

peut même avancer sans hésitation qu'elle se bornera à le poser. La classification sérologique des Entérobactéries est commencée depuis environ quarante ans. Il ne semble pas du tout qu'elle soit achevée. On vient de voir paraître un sous-genre de *Salmo-*

nella protéolytiques avec, bien entendu, déjà de nombreux sérotypes qui ne font que reculer les limites de ce genre déjà considérablement vaste. Il y a un travail considérable à accomplir pour tracer, si possible, les limites entre ce qui revient aux Entérobactéries et ce qui appartient aux *Achromobacteriae*. Il est pour l'instant hors de propos de formuler la moindre critique, ou même d'émettre la moindre réserve à l'égard des positions prises par les auteurs dans différents pays. Nous en sommes encore au stade de l'observation. Le problème est posé dans toute son objectivité ; le but est de simplifier les systématiques qui feront ensuite l'objet d'un travail de synthèse des plus souhaitables. Ceci fait comprendre que là où nous ne verrons que peu de parentés entre *Achromobacteriae* et *Enterobacteriaceae*, d'autres en souligneront de nombreuses. Cela va de soi et sera ainsi tant que

TABLEAU III. — Sérums anti-*Achromobacter* et autres bactéries à Gram négatif.

NOMS	NOMBRE	AGGLUTINATIONS		POUR-CENTAGE
		Mono-valentes	Poly-valentes	
ACINETOBACTER	15	5	5	66
PSEUDOMONADACEAE : <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Serratia</i> , <i>Empedobacter</i>				
TOTAL,	15	0	4	38
ENTEROBACTERIACEAE : <i>Escherichia</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Morganella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i>				
TOTAL,	44	9	2	24

Les Entérobactéries les plus souvent agglutinées ont été les *Morganella*, les *Klebsiella* et les *Salmonella*. Le cas des *Salmonella* a été discuté plus haut.

l'accord ne sera pas réalisé sur un même objet d'étude. Il n'y a donc pour le moment aucun espoir dans l'apport de résultats indiscutables. Les faits exposés sont rigoureusement dépendants de la systématique adoptée.

Les *Achromobacteriae*, telles que nous les entendons, comprennent environ une centaine d'espèces relativement bien étudiées. Notre enquête sérologique est une enquête statistique, basée sur la fréquence des communautés antigéniques entre les groupes étudiés.

TECHNIQUES.

Ce sont les techniques habituelles utilisées en sérologie et en sérotypie. Les microbes identifiés et fraîchement cultivés sur de grandes surfaces de gélose étaient mis en suspension en sérum physiologique et formolés à 2 p. 1 000. Les rares espèces auto-agglutinables furent bien entendu éliminées de l'expérimentation.

Les suspensions microbiennes titrant environ 2,5 milliards de germes/ml étaient conservées à + 4°.

Des lapins sélectionnés recevaient d'abord 0,5 ml de suspension microbienne, puis des doses croissantes tous les cinq jours (1,5

TABLEAU IV. — Sérums anti-Erwinia et Erwinia.

NOMS	NOMBRE	AGGLUTINATIONS	
		Mono- valentes	Poly- valentes
<i>Amylovora</i>	2		2
<i>Aroideae</i>	1		
<i>Atroseptica</i>	3		3
<i>Betivora</i>	2	I	I
<i>Betae gelatae</i>	2	I	
<i>Cacticida</i>	5		3
<i>Carnegieana</i>	16		14
<i>Carotovora</i>	6	I	4
<i>Cytolytica</i>	2	I	
<i>Dahliae</i>	4		4
<i>Dissolvens</i>	2		2
<i>Ichthyodermis</i>	4	I	3
<i>Jugis</i>	3	2	I
<i>Nimipressuralis</i>	9	3	I
<i>Petasisis</i>	2		
<i>Phytophthora</i>	4		4
<i>Punctata</i>	I		I
<i>Salmonis</i>	I		I
<i>Tracheiphila</i>	4		3
TOTAL	73	10	47

En résumé : Souches agglutinées, 77 p. 100 ; monovalentes, 14 p. 100 ; polyvalentes, 63 p. 100.

Il faut noter la forte proportion de souches polyvalentes. Les sérums 9 (*atroseptica*) et 10 (*dissolvens*) ont fourni les agglutinations les plus fortes et les plus fréquentes, notamment avec les souches *carnegieana*, *carotovora*, la souche pastorienne entre autres, et *atroseptica*.

à 2 ml). Après 6 ou 8 injections, ils étaient saignés à blanc, huit jours après avoir reçu la dernière dose de suspension microbienne. Nous avons obtenu ainsi des sérums titrant jusqu'à 1 800 et 2 500. Ces sérums étaient additionnés de sunoxol à 1/1 000 et conservés à + 4°. Pour l'emploi, ils étaient dilués au 1/40 ou 1/80 selon leur titre.

Nous avons ainsi préparé 33 sérums différents avec des souches de toutes provenances : humaines, vétérinaires, végétales, aquatiques, marines.

Les agglutinations ont été effectuées soit sur lames, soit plus

TABLEAU V. — Sérums anti-*Erwinia* et *Achromobacter*.

NOMS	NOMBRE	AGGLUTINATIONS	
		Mono- valentes	Poly- valentes
<i>Bookeri</i>	I		I
<i>Delicatulum</i>	9		6
<i>Desidiosa</i>	I		
<i>Desmolyticum</i>	I		I
<i>Fecaloides</i>	I		I
<i>Formosum</i>	2	I	
<i>Grypheae</i>	I		
<i>Hyperopticum</i>	I		
<i>Ichthyodermis</i>	I		I
<i>Iophagum</i>	2		
<i>Labrum</i>	I	I	
<i>Mira</i>	I		
<i>Multistriatum</i>	I		
<i>Mephitica</i>	I	I	
<i>Pestifer</i>	I		
<i>Pikowsky</i>	I		I
<i>Pinnatum</i>	I		
<i>Putrefaciens</i>	4	2	
<i>Salopium</i>	I	I	
<i>Stereotropis</i>	I		
<i>Superficiale</i>	I		I
<i>Tralucida</i>	I		
<i>Ureasophorum</i>	I		I
<i>Venenosum</i>	3		3
TOTAL	39	6	14

En résumé : Souches agglutinées, 53 p. 100 ; monovalentes, 17 p. 100 ; polyvalentes, 36 p. 100. — Les souches *delicatulum* furent fréquemment agglutinées par les sérums : 9 (*atroseptica*), 10 (*dissolvens*).

fréquemment et pour raison de commodité en tubes avec centrifugation de cinq minutes à 2 500 t/mn. Comme notre travail est avant tout un travail préliminaire de statistique, nous n'avons pratiqué aucun titrage d'agglutination avec nos sérums. Cette recherche est actuellement en cours.

Nos statistiques correspondent donc à des réactions d'agglutination positives avec des sérums dilués au 1/80. Ces réactions allaient d'une positivité correspondant à + (1/80), à une positivité de +++ et ++++ (1/800 à 1/1 600).

Les souches de référence n'ont pas été choisies au hasard : nous avons utilisé des germes tels qu'une *Erwinia carotovora* de collection (Institut Pasteur), des phytobactéries variées isolées de plantes malades (Université de Californie) de souches aussi caractéristiques que possible adressées par différents laboratoires.

On trouvera en annexe la liste et la provenance des souches utilisées pour la préparation des sérums.

TABEAU VI. — Sérum anti-*Erwinia* et autres bactéries à Gram-négatif.

NOMS	NOMBRE	AGGLUTINATIONS		POUR-CENTAGE
		Mono-valentes	Poly-valentes	
ACINETOBACTER	10	3	2	50
PSEUDOMONADACEAE :				
<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Empedobacter</i> , <i>Serratia</i>				
TOTAL	11	4	3	63
<i>Pseudomonas</i> et <i>Flavobacterium</i> ont été le plus fréquemment agglutinés.				
ENTEROBACTERIACEAE :				
<i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Cloaca</i>				
TOTAL	44	2	5	15

Souches le plus souvent agglutinées : *Morganella*, 1 par le sérum 10 (anti-dissolvens); *Cloaca*, 1 par le sérum 8 (anti-betivora); *Salmonella*, 4 par le sérum 13 (anti-carotovora).

La taxinomie de certaines bactéries achromogènes appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* comporte encore de sérieuses incertitudes. Il est entre autres difficile de différencier une *Erwinia* non gazogène d'un *Phytobacterium* et de certains *Achromobacter*.

On ne trouve aucun argument décisif. La production de gaz par un grand nombre d'*Erwinia* permet de les reconnaître aisément ; pour les autres, on fait appel au pouvoir pathogène plus ou moins spécifique pour une espèce végétale donnée. C'est là un critère des plus fragiles. Nous avons montré à plusieurs reprises avec C. Tysset, Jacob, Vacher, Y. Peloux, Menantaud, Ehrhardt notamment, la fréquence des *Erwinia* dans les eaux douces et salées, chez les animaux aquatiques se nourrissant de plantes, dans les fruits de mer et dans les sols. Ce sont des bactéries très répandues. En outre, nous avons pu établir leur pouvoir pathogène pour les animaux à sang chaud en partant d'espèces authentiquement phytopathogènes [3]. Ce critère d'action agressive élective pour les plantes a donc perdu une partie de sa valeur. Une étude ancienne de Nobécourt (1923) [4] avait du reste établi la virulence d'*Erwinia carotovora* pour la grenouille. Les recherches actuelles

TABLEAU VII. — Résumé de l'expérimentation.

SOUCHES	NOMBRE	Agglutinées par les sérums	
		anti- <i>Achromobacter</i>	anti- <i>Erwinia</i>
<i>Achromobacter</i>	38	70 %	53 %
<i>Erwinia</i>	73	73 %	77 %
<i>Acinetobacter</i>	15	66 %	50 %
<i>Pseudomonadaceae</i> ..			
Chromogènes	15	38 %	63 %
<i>Enterobacteriaceae</i> ..	44	24 %	15 %
TOTAL	185		

Total des épreuves d'agglutination : 6 105. — *Pseudomonadaceae* : 141 souches (moyennes d'agglutinations positives, 60,5 p. 100) ; *Enterobacteriaceae* : 44 souches (moyenne des agglutinations positives, 19,5 p. 100).

montrent que l'universalité de ces bactéries et leur spectre d'activité sont beaucoup plus vastes qu'on ne le pensait.

Toutes ces considérations ont donc dirigé notre choix non seulement dans la préparation des sérums, mais aussi dans les épreuves d'agglutinations comparées que nous avons effectuées. Au total plus de 185 souches ont été soumises à l'action de 33 sérums agglutinants. Ceci représente une enquête portant sur 6 105 agglutinations.

Les résultats sont rassemblés dans des tableaux que nous avons dû résumer au maximum et à l'essentiel ; il ne pouvait être question en effet de reproduire la totalité de l'expérimentation qui représente 6 105 épreuves.

DISCUSSION.

1° La grande diversité d'origine des souches étudiées fut une des conditions premières de cette étude de microbiologie comparée. Toutes les publications consacrées jusqu'ici à la sérologie des *Achromobacter*, des *Erwinia* et des germes voisins soulignent l'hétérogénéité de ces microbes. Si l'on s'arrête aux plus récentes enquêtes, il faut citer celles de Sackar et collaborateurs (1959) [5] et celles que l'on doit à Moore et Pickett (1960) [6] qui portent respectivement sur 200 souches voisines de l'espèce *Alcaligenes faecalis* et 40 bactéries, elles aussi proches des précédentes. Ces recherches n'apportent absolument rien de nouveau qui soit susceptible de faciliter la résolution du problème posé.

Les auteurs reconnaissent l'existence d'antigènes O et H comme il est de règle lorsque l'on s'adresse à des bactéries mobiles à Gram négatif. Ils constatent qu'il n'y a pas de correspondance entre les sérotypes et les types biochimiques. Des espèces identiques peuvent avoir un comportement sérologique différent. Il y a, autrement dit, plusieurs sérotypes dans une même espèce. On souligne l'hétérogénéité des *Achromobacter*.

Dans la majorité des cas, les auteurs se sont adressés au type *faecalis* et en ont fait le point de départ de leurs recherches. Ils ont constaté ce que d'autres avaient déjà établi et ce que confirme aussi M. Thibault, que le germe de Petruschky est en fait assez peu commun et ne serait qu'un cas particulier d'*Achromobacter*. Cette conclusion est celle d'une thèse soutenue à Bordeaux il y a bientôt dix ans (Barreau) [7].

Karl Klinge, en 1959 [8], accepte, lui aussi, cette conception. Il formule seulement des réserves à propos du genre *Acinetobacter* que nous avons créé en 1955 avec A.-R. Prévot pour différencier les *Achromobactereae* immobiles des formes ciliées. La sérologie a confirmé notre point de vue, comme nous le dirons dans un instant. Les observations faites au microscope électronique par Kambou, sous la direction de M^{me} Enjalbert, en 1959, viennent également appuyer cette thèse [9].

Quoi qu'il en soit, tous ces microbes sont maintenant reconnus comme appartenant à la tribu des *Achromobactereae*, ou tout au moins à la famille des *Pseudomonadaceae*. En effet, les divergences ne sont qu'apparentes et mineures : que l'on parle de *Pseudomonas achromogènes* (ce qui n'est pas un terme taxino-

mique), ou de *Pseudomonas* et *Achromobacter*, il s'agit toujours de *Pseudomonadaceae* (Gardner, Pines et Stewart ; Klinge, Moore et Pickett ; Sackar et coll. ; Buttiaux).

Cette étude sérologique confirme donc l'hétérogénéité des *Achromobacterae*, la présence de plusieurs sérotypes dans une même espèce, ainsi qu'en témoignent les tableaux et les commentaires qui les accompagnent.

On imagine alors combien sera difficile la tâche réservée à ceux qui voudront établir une sérotypie systématique des *Achromobacterae* à l'aide de sérums purs anti-O et anti-H. Ce travail est commencé ; nous disposons actuellement de 8 sérums O dont nous venons d'achever la préparation. Les premiers résultats des nouveaux tests seront, nous l'espérons, prochainement publiés.

Les tableaux montrent la fréquence des agglutinations croisées entre les *Erwinia* et les *Achromobacter* mobiles. On aurait pu attribuer cette polyvalence à la présence des antigènes H non spécifiques, mais en fait les agglutinations sont presque toujours de type O, fines et granulaires, laissant le liquide parfaitement clair.

Certaines agglutinations se présentent avec une notable fréquence. Nous avons en particulier obtenu de fortes agglutinations (1/320, 1/640) avec les sérums 9 et 10 préparés avec des *Erwinia atroseptica* et *dissolvens*, et 32 correspondant à un *Achromobacter superficiale*. Il semblerait donc que l'on puisse envisager un groupe d'*Achromobacterae* que caractériserait cette communauté antigénique O.

Un autre fait singulier tient à la fréquence des agglutinations croisées entre *Erwinia carnegieana* et *Achr. delicatulum*. Ces deux germes sont biochimiquement très voisins, seule la production de gaz dans les milieux sucrés par l'*Erwinia* permet de la différencier de l'*Achromobacter*, anaérogène par définition. On pense, devant cette observation, au judicieux rapprochement que l'on a fait entre *Escherichia* et *Alkalescens*.

Ceci montre aussi que nous sommes toujours bien, avec ces germes, dans la même famille des *Pseudomonadaceae*, comme l'ont toujours pensé Magrou et Prévot.

2° L'expérimentation confirme que des espèces biochimiquement identiques peuvent se comporter différemment sur le plan sérologique. Des bactéries appartenant à une même espèce, *Achr. venenosum*, *Achr. formosum*, *Erw. carnegieana*, par exemple, ne sont pas nécessairement agglutinées par les sérums préparés avec d'autres souches appartenant à la même espèce.

3° Les pourcentages d'agglutinations croisées entre *Erwinia* et *Achromobacter* sont suffisamment élevés pour qu'il soit permis

d'envisager un regroupement de ces deux genres dans la même tribu. C'est là un fait nouveau que l'on doit souligner. Il en résulterait une très appréciable simplification de la taxinomie de ces bactéries achromogènes qui font l'objet de nos entretiens. Il est frappant de constater que les *Achromobacter* sont presque aussi fréquemment agglutinés par les sérums anti-*Erwinia* que par les sérums anti-*Achromobacter*, et que les *Erwinia* sont elles-mêmes aussi souvent sensibles aux sérums anti-*Achromobacter* qu'aux sérums anti-*Erwinia*. Ces faits, que nous allons chercher à confirmer et à préciser, apporteront un argument supplémentaire à la simplification taxinomique que nous envisageons.

4° Les *Acinetobacter* sont, eux aussi, sensibles aux sérums anti-*Erwinia* et anti-*Achromobacter*. On trouve tantôt des agglutinations monovalentes, tantôt des agglutinations polyvalentes, toujours de type O bien entendu, puisqu'il s'agit d'espèces immobiles. La création de ce genre, qui sépare les espèces mobiles des immobiles, reste commode. On ne comprend pas pourquoi ne seraient pas accordés à ces *Achromobacteriaceae* immobiles les mêmes droits à un genre spécifique dont bénéficient les *Klebsiella* ou les *Shigella* dans la famille des *Enterobacteriaceae*, les *Welchia* dans celle des *Clostridiaceae*, et tant d'autres dans toutes les familles microbiennes.

Il est de fait entendu que les *Acinetobacter* correspondent aux *Moraxella* de M. Piéchaud et aux *Achromobacter* tels que vient de les envisager R. Buttiaux.

5° Avec les *Enterobacteriaceae* les agglutinations sont le plus souvent monovalentes, sauf en ce qui concerne certaines *Salmonella*. Les pourcentages atteignent environ 20 p. 100, ce qui, auprès des 60 p. 100 obtenus avec les autres bactéries achromogènes, reste relativement faible.

Quelques sérums, notamment ceux qui ont été préparés avec les souches *Erw. carotovora* (13), *Achr. venenosum* (25), *Achr. formosum* (62), ont donné des réactions d'agglutination intéressantes avec des souches de collection (Institut Pasteur). Il s'agissait toujours d'agglutinations granulaires de type O. On peut les résumer de la façon suivante :

SOUCHES	Sérums		
	13	25	26
<i>S. typhi</i>	+	—	—
<i>S. paratyphi</i> A	+	—	+
<i>S. paratyphi</i> B	+	X	—
<i>S. paratyphi</i> C	+	—	—
<i>S. groupe</i> D	+	+	+

Cependant, aucun des microbes ayant servi à préparer les sérums agglutinants n'avait de caractères pouvant faire soupçonner une appartenance au genre *Salmonella*. Ainsi :

Erw. caratovora (13) est protéolytique, indologène et attaque énergiquement le lactose.

Achr. venenosum (25) n'attaque aucun sucre et ne donne pas de nitrites en présence de nitrates.

Achr. formosum est protéolytique et ne transforme pas non plus les nitrates en nitrites.

Ces parentés entre *Salmonella* et *Achromobacteriae* méritent, elles aussi, de plus amples recherches.

Nous n'avons, par contre, pratiquement jamais obtenu d'agglutinations avec les *Escherichia*, cependant gazogènes et attaquant le lactose avec gaz.

8° *Erwinia nimipressuralis* semble constituer un groupe sérologique assez particulier, car sur 9 souches, 2 seulement ont été sensibles aux sérums anti-*Achromobacter* et 4 aux sérums anti-*Erwinia*.

9° Avec différentes *Pseudomonadaceae* chromogènes nous avons obtenu des agglutinations notables. Ce sont surtout les *Pseudomonas* et les *Flavobacterium* qui ont été le plus fréquemment agglutinés. Ces faits nous rapprochent du point de vue de Buttiaux : *Pseudomonas* chromogènes, *Pseudomonas* achromogènes, *Achromobacter* mobiles ou immobiles appartiennent bien à la même famille. Les génériques ne dépendant que des critères choisis, les noms d'espèces restent sans changements et, au fond, n'est-ce pas l'essentiel ? Si nous nous accordons sur la famille à laquelle appartiennent toutes ces bactéries et sur le nom des espèces, nous pouvons déjà être satisfaits.

CONCLUSION.

S'il n'est pas encore possible de dresser un bilan, même réduit, des facteurs antigéniques autorisant une sérotypie des *Achromobacteriae*, il ne faut en être ni surpris, ni découragé. Le travail sera long ; il exigera de nombreuses recherches et de patients efforts.

Au lieu d'entreprendre une tâche qui ne pouvait aboutir qu'à des résultats fragmentaires, avec un nombre restreint de souches et de sérums, nous avons préféré choisir la voie de la microbiologie comparée de toutes les bactéries à Gram négatif achromogènes. En faisant appel à 33 sérums agglutinants aussi différents que possible et à de très nombreuses souches isolées des milieux les plus variés, il nous a été possible d'envisager l'enquête sur le plan tribal en cherchant à définir ce que pourraient être les *Achromobacteriae*. Un total de 6 105 agglutinations résume cette

expérimentation. Les pourcentages d'agglutinations croisées entre *Erwinia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonadaceae* variés sont assez significatifs pour penser que tous ces germes appartiennent bien à la même famille.

On confirme ainsi la conception taxinomique française de Magrou et Prévot.

Cette première enquête, qui reste un simple travail de déblayage et rien de plus, permet d'envisager un regroupement de toutes les bactéries à Gram négatif achromogènes dans une même tribu, celle des *Achromobacterae*. Il est plus juste d'employer en ce moment ce terme tribal, très général, plutôt que celui d'*Achromobacter* encore en discussion et trop restrictif pour le travail sérologique qui a été entrepris ici. D'étroites parentés unissent *Erwinia* et *Achromobacter* traditionnels, mobiles ou non. Seule l'aérogénèse différencierait les genres de ce groupe microbien.

TABLEAU VIII. — Origine des souches ayant servi à la préparation des sérums.

ACHROMOBACTER.

<i>Achromobacter</i>	<i>agile</i> :	eau de mer (Manche).	Sérum n° 20.
—	<i>bookeri</i> :	homme.	Sérum n° 5.
—	<i>delicatulum</i> :	écrevisse.	Sérum n° 22.
—	<i>formosum</i> :	eau de puits.	Sérum n° 26.
—	—	moules d'eau douce.	Sérum n° 31.
—	<i>ichthyodermis</i> :	poisson de mer.	Sérum n° 14.
—	<i>iophagum</i> :	écrevisse.	Sérum n° 23.
—	—	huîtres de Marennes.	Sérum n° 28.
—	<i>mariense</i> :	homme.	Sérum n° 24.
—	<i>pikowsky</i> :	poisson d'eau douce.	Sérum n° 29.
—	<i>putrefaciens</i> :	homme.	Sérum n° 27.
—	<i>recti</i> :	homme.	Sérum n° 30.
—	<i>venenosum</i> :	homme.	Sérum n° 33.
—	—	huîtres de Marennes.	Sérum n° 25.

ERWINIA.

<i>Erwinia</i>	<i>atroseptica</i> :	carpe.	Sérum n° 2.
—	—	gardon.	Sérum n° 9.
—	<i>betivora</i> :	eau de mer.	Sérum n° 16.
—	—	homme.	Sérum n° 8.
—	<i>carnegieana</i> :	perche.	Sérum n° 7.
—	<i>carotovora</i> :	homme.	Sérum n° 13.
—	—	Institut Pasteur.	Sérum n° 21.
—	<i>dahliae</i> :	perche.	Sérum n° 7.
—	<i>betivora</i> :	eau de mer.	Sérum n° 18.
—	<i>ichthyosmia</i> :	carpe.	Sérum n° 12.
—	—	homme.	Sérum n° 3.
—	—	vésicule biliaire de gardon.	Sérum n° 11.
—	<i>salmonis</i> :	truite.	Sérum n° 4.
—	<i>dissolvens</i> :	coquille Saint-Jacques.	Sérum n° 10.
—	<i>tracheiphila</i> :	eau de mer ; Nouméa.	Sérum n° 15.

Ce tableau souligne l'extrême diversité d'origine des souches utilisées pour la préparation des sérums agglutinants.

On aboutit, en définitive, à une note taxinomique qui pourrait par la suite faciliter les nouvelles enquêtes sérologiques. Il faudra alors choisir des prototypes d'*Achromobacteriae*, aussi bien définis et aussi stables que possible, qui serviront de base à la préparation de sérums standard spécifiques O pour commencer, H par la suite.

On comprend qu'une telle entreprise ne puisse être réalisée en quelques mois.

On entrevoit le rôle de plus en plus étendu des *Achromobacteriae* en médecine, ainsi que M^{me} Enjalbert vient encore de le souligner. Certaines espèces isolées d'aliments souillés, d'affections variées, laissent prévoir l'ouverture d'un nouveau chapitre de la pathologie qui, sans éclipser celui des entérobactérioses, pourrait en devenir un équivalent. Comme il a été dit au début de ce travail, le problème est posé. Il importe de nous accorder sur les termes ; il faut souhaiter aussi des échanges de matériaux, souches, sérums, une standardisation rigoureuse des techniques d'étude. A ce prix, mais à ce prix seulement, on peut espérer des résultats satisfaisants et utiles dans un avenir relativement proche.

*
* *

Une partie des souches utilisées pour ce travail nous a été fournie par :

M. le Professeur Starr (Université de Californie), M. le D^r Shewan (Aberdeen-Torry Res. Labor.), MM. les Professeurs Andrieu, Enjalbert, M. le D^r Kambou (Toulouse), M. le Professeur Moustardier, MM. les D^{rs} Saout et Ehrhardt (Bordeaux), M. le D^r Peloux (Nouméa, Inst. Pasteur), M. le Professeur A.-R. Prévot (Inst. Pasteur, Paris), M. le D^r Courtieu (Inst. Pasteur, Lyon), MM. les D^{rs} Tysset, Vacher et Jacob (Service vét. de l'Armée et Inst. Pasteur d'Alger), M. Cadeillan (Service vét. de la Vienne) et M. B. Brisou (Marine, Diego Suarez), à qui nous exprimons notre vive gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRÉVOT (A.-R.) et MAGROU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 99.
- [2] PRÉVOT (A.-R.). In THOMAS (André). *Problèmes d'Organisation et de fonctions chez les bactéries et les virus*, Masson, édit., Paris, 1958, p. 60.
- [3] BRISOU (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 4230.
- [4] NOBÉCOURT (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **83**, 1041.
- [5] SACKAR (J. K.), CHOUDHURY et TRIBEDI. *Ind. J. med. Res.* 1959, **47**, 1.
- [6] MOORE et PICKETT. *Canad. J. Microbiol.*, 1960, n° 1, 43.
- [7] BARREAU. *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1953.
- [8] KLINGE (K.). *Arch. Hyg.*, 1959, **143**, 8.
- [9] KAMBOU. *Thèse Pharmacie*, Toulouse, 1959.

LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES *PSEUDOMONAS*, *ACHROMOBACTER* ET "*B5W-BACTERIUM ANITRATUM*"

par Y. CHABBERT et A.-L. COURTIEU.

(Institut Pasteur de Paris et Institut Pasteur de Lyon)

Si les *Pseudomonas*, les *Achromobacter* et les bactéries analogues sont aujourd'hui au premier plan de l'actualité bactériologique, c'est en grande partie aux antibiotiques qu'elles le doivent. La résistance de ces bactéries permet leur sélection, d'où une augmentation relative de leur fréquence (Enjalbert [14]). L'intérêt de l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques est double : d'une part le laboratoire a un rôle important dans la solution des difficiles problèmes thérapeutiques qu'elles posent, et d'autre part l'étude des « antibiotypes » est peut-être susceptible d'apporter des éléments destinés à établir leur position.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

TECHNIQUES. — La détermination de la sensibilité microbienne aux antibiotiques a été faite par deux techniques.

a) *Technique de diffusion* en gélose utilisant les disques fournis par l'Institut Pasteur de Paris sur le milieu spécial préparé par cet institut et sur milieu Brain Heart Infusion Agar (Difco). L'inoculum était réglé pour obtenir des colonies denses, mais isolées. Dans certains cas, l'incubation a été faite à 30°. La lecture a été faite par rapport à une souche test sur les abaques publiés par l'un de nous [41]. Cette technique a été utilisée de préférence pour la détermination de la sensibilité au chloramphénicol, tétracycline, streptomycine et néomycine.

b) *Technique de dilution en gélose* par la technique des stries sur milieu pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques avec un inoculum de l'ordre 10^6 bactéries. Les conditions détaillées des titrages faits avec le méthane sulfonate de colistine ont été publiées par ailleurs [43]. Cette technique a été utilisée de préférence pour les déterminations de la sensibilité vis-à-vis de la pénicilline G, de la diméthoxyphényl pénicilline, érythromycine,

novobiocine et méthane sulfonate de colistine (colimycine injectable).

La production de pénicillinase a été étudiée suivant la technique décrite par Gots [47], en utilisant comme germes tests *Staph. aureus* 209 P et *Sarcena lutea* ATCC 5345.

SOUCHES. — Cette étude a porté sur 486 souches dont le détail, le nom et l'origine figurent en tête des paragraphes suivants. Certaines séries de souches n'ont été titrées que vis-à-vis de tel ou tel antibiotique.

RÉSULTATS.

I. — *Pseudomonas aeruginosa*.

En raison de sa fréquence clinique, le comportement des antibiotiques vis-à-vis de *P. aeruginosa* a été très étudié, mais les résultats ont souvent été contradictoires. Cela tient à plusieurs faits : a) Dans la population d'une souche déterminée, les individus microbiens présentent une grande hétérogénéité de sensibilité. Henneberg et Muller [49], en 1954, travaillant sur 22 souches de *Ps. aeruginosa*, isolent pour chaque souche 100 colonies et montrent pour quatre antibiotiques que la sensibilité de ces colonies se répartit sur un éventail de concentrations qui va de la sensibilité à la résistance. b) *Ps. aeruginosa* produit une pénicillinase et une substance inhibitrice de la streptomycine (Arquié et coll. [2], Lightbrown [21]). c) Il y a en outre une discordance nette entre les résultats obtenus par les méthodes de diffusion et les méthodes de dilution pour les tétracyclines, et entre les méthodes de dilution en milieu liquide ou en milieu gélosé pour les antibiotiques de la famille des néomycines. d) Les limites entre la sensibilité et la résistance sont aussi appréciées très différemment. Certains auteurs envisagent seulement un traitement local et placent très haut (vers 100 µg/ml) la limite de la résistance. e) Enfin, depuis quinze ans, la sensibilité a évolué d'une façon qui a été diversement appréciée. Nous essaierons de dégager les faits principaux qui ressortent des études de Finland et coll. [15, 40], Waisbren et Strelitzer [39], aux Etats-Unis, et de Lütz et coll. [24, 25], Andrieu, Monnier et Bourse [4], Chabbert et coll. [12], Bertoye et Courtieu [3], Moustardier et coll. [31], en France.

Les résultats de la sensibilité vis-à-vis de cinq antibiotiques obtenus sur 86 souches isolées par Buttiaux, à l'Institut Pasteur de Lille et étudiées par la méthode des disques, et ceux de 119 souches étudiées par Courtieu et coll. [13], vis-à-vis du sulfate de colistine par la méthode de dilution en gélose, sont figurés sur le tableau I.

Ces résultats doivent être complétés par ceux fournis par différents auteurs pour avoir une idée d'ensemble de la sensibilité et de son évolution pour les différents antibiotiques.

En ce qui concerne leur sensibilité à la *streptomycine*, les *Ps. aeruginosa* se répartissent habituellement en deux populations. L'une se situe plus ou moins haut dans la zone de sensibilité limite suivant les auteurs ; le pourcentage maximum de souches se situe ici autour de 16 $\mu\text{g/ml}$; il est de 10 à 20 $\mu\text{g/ml}$ pour Lütz [25], de 50 $\mu\text{g/ml}$ pour Finland, de 50-100 $\mu\text{g/ml}$ pour Bourse [4]. La

TABLEAU I. — *Pseudomonas aeruginosa*.

	C.M.I. ($\mu\text{g/ml}$)								
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	R
STREPTOMYCINE	2	2	1	4	14	26	5	2	30
NÉOMYCINE	2	1	3	5	13	33	29
TÉTRACYCLINE	2	1	.	.	.	79
CHLORAMPHÉNICOL .	.	1	5	70
COLISTINE	8	8	44	53	6

deuxième population est composée de souches nettement résistantes, inhibées par des concentrations supérieures à 100 et même 1 000 $\mu\text{g/ml}$. L'importance respective de ces deux populations est évidemment variable. Graber [48] signale que les souches isolées chez les grands brûlés sont presque toutes résistantes, tandis que les souches isolées des selles seraient sensibles. Le traitement sélectionne certainement les souches résistantes. Bourse [4] publie des diagrammes très nets à cet égard. Au cours des années, une évolution s'est faite en général vers l'augmentation de la proportion des souches résistantes à la streptomycine. Nous avons signalé cette évolution progressive entre 1949 et 1952 (Chabbert et coll. [42]). Pour Finland et coll., le pourcentage des souches résistantes à 400 $\mu\text{g/ml}$ passe de 13 à 44 p. 100. Waisbren et Strelitzer [39], comparant les résultats de 1956 avec ceux de 1958, notent un phénomène analogue. Cependant Lütz et coll. [25] inversement signalent de 1953 à 1957 une diminution régulière (81 à 65 p. 100) du pourcentage de souches résistantes.

Vis-à-vis de la *néomycine*, les résultats de la méthode des disques montrent une majorité de souches de sensibilité limite ou résistantes. Il n'y a, en fait, que 28 p. 100 des souches sensibles à moins de 50 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats sont en accord avec les études

de Finland et Bourse faites par la technique des dilutions en milieu gélosé ; mais ces chiffres sont en contradiction avec ceux des auteurs qui ont étudié la sensibilité des *Ps. aeruginosa* à la néomycine en milieu liquide. Par cette technique, Yow [41] et Bourse [4] trouvent 50 p. 100 de souches sensibles à moins de 15 µg/ml et Lütz et coll. [25] 90 p. 100, aussi bien en 1955 qu'en 1957. Ces discordances sont dues probablement à l'effet de certains sels dans les méthodes de diffusion et de dilution en gélose. Cet antibiotique étant utilisé en usage local, il est difficile d'en évaluer l'activité exacte et de la comparer aux résultats obtenus *in vitro*.

Comme pour la streptomycine, une évolution vers la résistance à la néomycine entre 1948 et 1954 est signalée par Finland [40] et entre 1956 et 1958 par Waisbren [39]. Le rôle des traitements dans cette sélection n'étant pas très net, il faut faire intervenir pour expliquer ce phénomène la résistance croisée bien connue entre la streptomycine et la néomycine (Monnier et Quercy [30]).

Pour les *tétracyclines*, un problème analogue se pose. Le tableau I fait apparaître peu de souches sensibles à la tétracycline. Il en est de même pour la chlortétracycline et l'oxytétracycline. Sur 86 souches éprouvées, une seule montre une résistance aux deux premiers antibiotiques et une grande sensibilité à l'oxytétracycline. Or, cette activité particulière de l'oxytétracycline apparaît nettement dans les études faites en milieu liquide. Cette spécificité d'action, signalée dès l'apparition de cet antibiotique ressort nettement des derniers chiffres publiés par Lütz et coll. [25] en 1957. Sur 100 souches, cet auteur observe que la grande majorité des souches sont inhibées par moins de 10 µg/ml d'oxytétracycline, tandis qu'il faut entre 10 et 100 µg/ml de tétracycline. Le rapport des concentrations inhibant le plus grand nombre de souches de l'un et l'autre produit est de 1 à 4. Mais une telle différence ne se rencontre pas aussi nettement par la technique des dilutions en milieu solide, où l'oxytétracycline se montre à peine deux fois plus active que la tétracycline. Les raisons exactes de cette activité élective de l'oxytétracycline et les divergences selon les techniques n'ont jamais été nettement élucidées.

Peu de souches de *Ps. aeruginosa* sont sensibles actuellement au *chloramphénicol*. Entre 1944 et 1952, nous avons observé [12] la disparition des souches sensibles. Actuellement, quelle que soit la technique utilisée, moins de 10 p. 100 des souches sont inhibées par des concentrations inférieures à 50 µg/ml.

En fait, les seuls antibiotiques réellement actifs actuellement sont ceux de la famille des *polymyxines* : le sulfate de polymyxine B, toxique et surtout utilisé en usage local, s'est toujours

montré actif sur l'ensemble des souches. Dans les diverses études faites par Finland, la presque totalité des souches étaient inhibées par des concentrations de l'ordre de 3 à 6 $\mu\text{g/ml}$ et il n'y avait pas de souches résistantes. Depuis quelques années est apparue la colistine (colimycine), dont un sel, le méthane sulfonate, peu toxique, peut être utilisé par voie générale. Dans le tableau I on voit que 97 souches sur 119 sont inhibées par des concentrations inférieures à 3 $\mu\text{g/ml}$. Il ne semble pas y avoir eu d'évolution vers la résistance depuis que la polymyxine et la colistine sont utilisées ; cette résistance est du reste très difficile à obtenir *in vitro* pour *Ps. aeruginosa* et elle est peu stable.

Cette étude de la sensibilité de *Ps. aeruginosa* vis-à-vis des antibiotiques apporte des éléments utiles aux points de vue bactériologique et thérapeutique.

Au point de vue bactériologique, l'« antibiotype » de *Ps. aeruginosa* peut se définir par une sensibilité aux polymyxines, une résistance variable mais toujours assez grande à la famille des streptomycines-néomycines, aux tétracyclines et au chloramphénicol, et une résistance complète vis-à-vis des macrolides et de la pénicilline. Finland [40] et Bourse [4] n'obtiennent une inhibition pour la presque totalité des souches qu'avec 200 à 400 $\mu\text{g/ml}$ d'érythromycine, et Franck [15] n'inhibe pas 32 souches sur 33 avec 1 000 $\mu\text{g/ml}$ de pénicilline G. Il y a naturellement quelques exceptions, mais dans l'ensemble *Ps. aeruginosa* semble plus résistant que les autres *Pseudomonas*.

Les antibiotiques ont, en outre, une action sur la production de pyocyanine. Les souches les plus résistantes à la streptomycine isolées de préférence à la suite d'un traitement, sont des souches apigmentées. Pour Bourse [4], toutes les souches apyocyanogènes sont insensibles à 800 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine, mais elles élaborent quand même un pigment fluorescent très net. Selon ce même auteur, dans les gammes de dilution, on peut observer des variations de production de pyocyanine pour des concentrations sub-inhibitrices de streptomycine, néomycine, tétracycline avec un phénomène de zone inconstant. Schneierson et coll. [34] ont récemment observé sur 3 souches sur 4 de *Ps. aeruginosa* une disparition complète et permanente de la production de pyocyanine en présence de concentrations sub-inhibitrices de chloramphénicol et d'érythromycine. Ces altérations permanentes ou transitoires de la pigmentogénèse sous l'influence des traitements aux antibiotiques affaiblissent certainement la valeur taxinomique de ce caractère chez les souches isolées en clinique.

Au point de vue thérapeutique, il n'est pas question de faire ici une revue générale des succès et des échecs enregistrés avec les différents antibiotiques. D'une façon très générale, les polymyxines, et actuellement le méthane sulfonate de colistine, sont

les antibiotiques de choix qui ont donné les résultats les plus constants. La streptomycine s'est montrée très irrégulière dans son action *in vivo* en discordance avec son activité *in vitro* sur la souche pathogène. A côté de ces antibiotiques majeurs, les études *in vitro* montrent que les tétracyclines sont peu actives et surtout très peu bactéricides, et les sulfamides uniquement bactériostatiques dans les 2/3 des cas (Mollaret et Warluzel [29]), cependant les deux sont capables de donner des synergies bactériostatiques et bactéricides nettes avec les polymyxine B ou le méthane sulfonate de colistine (Bunn et coll. [8], Vacca [37], Bourse [4], Andrieu et coll. [1]). Une étude précise dans chaque cas particulier de septicémie ou de méningite à *Ps. aeruginosa*, des associations de colistine, oxytétracycline et streptomycine s'impose. Les meilleures associations actuelles ne seront pas exemptes d'échecs et le traitement des septicémies et endocardites à bacille pyocyanique reste difficile.

II. — *Ps. fluorescens* ET GROUPE *Maltophilia*.

Il a paru intéressant de rapprocher le comportement des antibiotiques vis-à-vis de deux sortes de bactéries susceptibles d'être apparentées. Le premier groupe comprend 15 souches de *Ps. fluorescens* de la collection de M. Véron [38], et le deuxième groupe, 20 souches de bactéries à Gram négatif, protéolytiques, à ciliature polaire, isolées de produits pathologiques (hémocultures, pus, expectorations, L. C. R.) et de contaminations, isolées de sang conservé et de cultures de tissus. Ces souches, rangées initialement dans le groupe *Alcaligenes*, ont été étudiées et leur caractère discuté au cours de cette séance par P. Thibault [36]. Elles sont désignées ici sous le nom de groupe *Maltophilia*.

Un certain nombre de différences apparaissent entre ces deux groupes (tableau II).

L'érythromycine, que nous avons vu complètement inactive sur les *Ps. aeruginosa*, est inactive aussi sur les *Ps. fluorescens* : 14 souches sur 15 ne sont pas inhibées par 64 µg/ml. Par contre, les bactéries du groupe *Maltophilia* montrent une sensibilité variable et partielle mais nette. Ces souches ont été titrées par la méthode de dilution en gélose, par la technique des stries avec un inoculum de l'ordre de 10^6 bactéries. Pour la presque totalité des souches, l'érythromycine ne provoque pas un arrêt net de l'ensemble de l'inoculum. Entre la concentration inhibant totalement la croissance et la concentration qui n'inhibe qu'une partie importante des bactéries (inhibition partielle), on observe un écart. Ce phénomène, ici très intense, montre une grande hétérogénéité de comportement de ces populations. Sur le tableau II, figure la

TABLEAU II. — *Ps. fluorescens* et « groupe *Maltophilia* ».

	C.M.I. ($\mu\text{g/ml}$)								
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	R
ÉRYTHROMYCINE :									
Ps. fluorescens	1	.	.	14
Gr. maltophilia..	IP	(4)	(3)	(5)	(3)	(4)			(1)
	IT	2	.	1	2	2	5	2	6
STREPTOMYCINE :									
Ps. fluorescens	1	.	3	2	3	4	2
Gr. maltophilia..	.	1	.	2	.	1	1	.	15
CHLORAMPHÉNICOL :									
Ps. fluorescens	1	1	1	2	10
Gr. maltophilia..	.	.	7	3	9	1	.	.	.
TÉTRACYCLINE :									
Ps. fluorescens	4	7	.	4
Gr. maltophilia..	2	1	2	4	4	3	.	.	.
COLISTINE :									
Ps. fluorescens ..	2	4	4	4
Gr. maltophilia..	1	9	8	1	1

répartition de ces deux points limites pour nos souches. Quel que soit le point limite choisi, la sensibilité de beaucoup de souches du groupe *Maltophilia* est beaucoup plus grande que celle des *Pseudomonas aeruginosa* ou *fluorescens*.

Vis-à-vis de la *streptomycine* on retrouve avec les *Ps. fluorescens* l'ébauche des deux populations que nous avons rencontrées avec *Ps. aeruginosa* : l'une de sensibilité limite et l'autre résistante. Il y a peu de souches résistantes, ce qui est en accord avec les constatations de divers auteurs. Les bactéries du groupe *Maltophilia*, par contre, montrent 2/3 de souches résistantes et une grande dispersion des souches sensibles ou limites.

Des différences de comportement analogues se rencontrent dans la sensibilité de ces deux groupes de bactéries vis-à-vis des *tétracyclines* et du *chloramphénicol*. Les *Ps. fluorescens* se sont montrés assez peu sensibles avec des répartitions voisines de celles des *Ps. aeruginosa*. Les souches du groupe *Maltophilia* sont beaucoup plus sensibles et sont très dispersées.

Enfin, les deux groupes ont une égale sensibilité vis-à-vis des antibiotiques de la famille *polymyxine-colistine*. Une souche de *Ps. fluorescens* cependant s'est montrée peu sensible. La présence de telles souches est signalée par Janbon et coll. [20]

depuis 1953 dans des cas de méningites. Malgré cela ces antibiotiques sont nettement les antibiotiques de choix pour ces bactéries.

Cette étude a porté sur un très petit nombre de souches ; des résultats obtenus vis-à-vis de cinq antibiotiques, on ne peut tirer aucun fait tendant à montrer que ces deux groupes de bactéries sont susceptibles d'être apparentés.

III. — B5W, *B. anitratum* ET BACTÉRIES ANALOGUES.

Il nous a paru intéressant aussi d'étudier et de comparer la sensibilité vis-à-vis des divers antibiotiques de 250 souches portant des dénominations très diverses, mais dont certaines désignent des bactéries soit identiques, soit susceptibles d'être apparentées. Les dénominations et l'origine de ces souches sont les suivantes :

12 *Achromobacter* (Buttiaux, Institut Pasteur, Lille) ;

11 *Moraxella lwoffii* (Piéchaud et Second, Institut Pasteur, Paris) ;

98 *Moraxella lwoffii* (Courtieu, Institut Pasteur, Lyon) ;

6 *Mima polymorpha* (Miss O. King) ;

4 B5W (Buttiaux, Institut Pasteur, Lille) ;

10 *Bacterium anitratum* (E. Lund, Copenhague) ;

12 *Moraxella glucidolytica* (Piéchaud et Second, Institut Pasteur, Paris) ;

89 *Moraxella glucidolytica* (Courtieu, Institut Pasteur, Lyon) ;

4 *Diplococcus mucosus* (Seeliger, Bonn) ;

4 *Acinetobacter* (Enjalbert, Kambou, Toulouse).

Les publications connexes de Buttiaux [9], Piéchaud [33], Courtieu [13], Brisou [5], précisent les caractères bactériologiques de certaines de ces bactéries.

Nous comparerons les résultats obtenus avec les études antérieures sur la sensibilité aux antibiotiques faites par Brooke [6] sur B5W *B. anitratum*, Brooks et Sanders [7] sur les *Mimæ*, Lund [23] sur *B. anitratum*, Linzenmeier [22] sur *Diplococcus mucosus*, Lütz et coll. [24, 26] sur *B. anitratum* et Peloux [32] sur *Moraxella lwoffii* et *Moraxella glucidolytica*.

Pénicilline, érythromycine, novobiocine. — Nous avons vu que les *Pseudomonas* sont fortement résistants à ces trois antibiotiques. Ils produisent de plus une pénicillinase, très nette pour toutes les souches de *Ps. fluorescens* que nous avons étudiées et plus difficile à mettre en évidence pour *Pseudomonas aeruginosa* en raison de l'activité antagoniste de la pyocyanine vis-à-vis des souches tests qui servent à la mise en évidence de cette pénicillinase. Par opposition, une certaine sensibilité des bactéries étudiées ici apparaît vis-à-vis de ces antibiotiques.

La sensibilité à la *pénicilline G* a même été introduite comme un caractère taxinomique ; Shewan [35], Buttiaux [40], Gagnon [46] considèrent qu'une grande sensibilité à la pénicilline permettrait de caractériser les *Achromobacter*. D'autre part, Piéchaud [33] pense que dans le genre *Moraxella*, *M. duplex* et *lacunata* sont sensibles tandis que *M. lwoffii* et *glucidolytica* sont résistantes (tableau III).

TABLEAU III. — Pénicilline G.

NOMBRE DE SOUCHES	NOM ET ORIGINE	C.M.I. ($\mu\text{g/ml}$)							
		0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	> 10 R
12	ACHROMOBACT. (I.P. Lille)	1 (—)	1	.	.	2	.	.	8 (+)
11	MORAX. LWOFFI (I.P. Paris)	.	.	2 (—)	.	1 (+)	2 (+)	2 (+)	4 (+)
98	MORAX. LWOFFI (I.P. Lyon)	.	1	1	3	8	4	15	66
5	MIMA POLYM. (King)	1	4
4	B 5 W (I.P. Lille)	4 (+)
12	MORAX. GLUCIDOLYTICA (I.P. Paris).....	.	1 (—)	.	1 (—)	1	.	.	9 (+)
89	MORAX. GLUCIDOLYTICA (I.P. Lyon)	1	.	2	.	3	83
10	BACT. ANITRATUM (Lund)	10
6	HERELLA VAGIN. (King)	6
4	DIPL. MUCOSUS (Seeliger).	4
4	ACINETOBACTER (Marsh.).	Anitr. Winog. Metalc.

Le tableau III montre les résultats que nous avons obtenus avec les souches étudiées ici. Les *Achromobacter* possèdent 4 souches sensibles d'origine ancienne et 8 souches résistantes beaucoup plus récentes. *Moraxella lwoffii* comporte près d'un tiers de souches apparemment sensibles. Par ailleurs, le groupe B5W, *M. glucidolytica*, *B. anitratum*, etc., ne comporte presque que des souches résistantes. Nous avons recherché la production de pénicillinase pour 36 de ces souches, les résultats sont figurés entre parenthèses. Toutes les souches dont la sensibilité dépassait 0,5 $\mu\text{g/ml}$, ont été trouvées productrices de pénicillinase. Rien ne prouve, pour les souches les plus sensibles, qu'une culture en présence de pénicilline ne permettrait pas d'induire la production de cette enzyme. Ce caractère de production de pénicillinase nous semble rendre très aléatoire l'utilisation de la sensibilité à la pénicilline comme caractère taxinomique.

Nous avons recherché si, par contre, ces souches ne seraient pas très sensibles à la diméthoxyphényl-pénicilline dérivée de l'acide α -pénicillanique. La sensibilité est variable, et dans l'ensemble plutôt faible. Certaines souches d'*Achromobacter* et de *Moraxella glucidolytica* fortement productrices de pénicillinase anti-pénicilline G, se sont montrées capables d'élaborer une substance diffusible inhibitrice de cette pénicilline synthétique. La sensibilité à son égard ne semble pas non plus devoir être utilisée.

L'ensemble des bactéries étudiées ici montrent par contre une sensibilité à l'érythromycine beaucoup plus grande que celle habituellement rencontrée chez les Entérobactéries ou les *Pseudomonas*.

Les 217 souches titrées se sont toutes montrées sensibles à des concentrations inférieures à 16 $\mu\text{g/ml}$. Dans l'ensemble les concentrations minima inhibitrices sont comprises entre 2 et 16 $\mu\text{g/ml}$, le groupe *Moraxella lwoffii*-*Mima polymorpha* étant plus sensible que le groupe B5W-*B. anitratum*-*Moraxella glucidolytica*. Ces chiffres sont en accord avec ceux de Lund [23], Linzenmeier [22], Lütz [26]. Peloux [32] cependant trouve une sensibilité légèrement plus grande.

Il s'agit d'une sensibilité limite, d'importance discutable en thérapeutique, mais qui caractérise assez nettement ces bactéries.

Le comportement de la novobiocine est très voisin de celui de l'érythromycine. Une étude plus poussée de l'action de cet antibiotique serait nécessaire.

Chloramphénicol. — La sensibilité de ces bactéries au chloramphénicol est très particulière (tableau IV).

Le premier groupe de bactéries du tableau IV comporte 115 souches de *Moraxella lwoffii* et *Mima polymorpha*. Elles se montrent toutes extrêmement sensibles au chloramphénicol à des concentrations inférieures à 15 $\mu\text{g/ml}$. Le deuxième groupe comprend 92 souches de *Moraxella glucidolytica*, B5W, *B. anitratum* non protéolytiques, dont 87 p. 100 sont résistantes à plus de 15 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol. Ce caractère de résistance est très anciennement connu dans la littérature. En 1951, Brooke [6] signalait 85 souches résistantes sur 86 de B5W, *B. anitratum*; en 1954, Lund [23] notait 95 p. 100 de souches résistantes sur 77 souches de *B. anitratum*; en 1955, Linzenmeier [22] trouve 20 souches résistantes de *Diplococcus mucosus* (*B. anitratum*); en 1958, sur 93 souches de *B. anitratum*, Lütz et coll. [26] trouvent 83,8 p. 100 de résistantes.

Ce caractère, joint à une sensibilité plus grande aux tétracyclines, est donc bien une caractéristique de ce groupe.

Le troisième groupe de bactéries de notre tableau IV est plus hétérogène. Il faut cependant noter que vis-à-vis du chloramphé-

nicol les souches *protéolytiques* de *Moraxella glucidolytica* se montrent plus sensibles que les souches non protéolytiques et occupent une position intermédiaire entre ces dernières et *Moraxella lwoffii*.

TABLEAU IV. — Chloramphénicol.

NOMBRE DE SOUCHES	NOM ET ORIGINE	C.M.I. ($\mu\text{g/ml}$)							
		I	2	4	8	16	32	64	R
98	MORAX. LWOFFI (I.P. Lyon)	66	17	5	3	6	.	I	.
11	MORAX. LWOFFI (I.P. Paris).....	4	4	.	3
6	MIMA POLYM. (King)	3	I	I
69	MORAX. GLUCID. (NP) (I.P. Lyon)	5	4	I	.	3	7	22	27
12	MORAX. GLUCID. (NP) (I.P. Paris).....	.	2	I	9
4	B 5 W (I.P. Lille)	4
7	BACT. ANITR. (NP) (Lund)	I	I	I	4
20	MORAX. GLUCID. (P) (I.P. Lyon)	6	I	I	I	6	I	4	.
3	BACT. ANITR. (P) (Lund)	.	.	I	I	.	I	.	.
8	ACHROMOB. (I.P. Lille)	I	3	4
4	ACINETOB. (Kambou)....	Mars.	.	.	Métalc	.	.	.	Anitr. Winog

Tétracycline, *streptomycine*, *colistine* (tableau V). — Les trois antibiotiques qui figurent sur ce tableau sont beaucoup plus actifs que les précédents. La *tétracycline* se montre dans l'ensemble active aussi bien sur *Moraxella glucidolytica* que sur *Moraxella lwoffii*. Cette sensibilité de *Moraxella glucidolytica* à la tétracycline contrastant avec la résistance au chloramphénicol fait que cette bactérie possède un « antibiotype » très particulier que l'on ne rencontre pas dans d'autres bactéries à Gram négatif. Au point de vue thérapeutique cependant, les tétracyclines sont assez peu bactéricides.

Vis-à-vis de la *streptomycine* nous avons deux populations, l'une sensible, l'autre résistante. Cette dernière représente ici environ 45 p. 100 des souches, mais elle est variable suivant les statistiques publiées : 37 p. 100 pour Brooke [6], 39 p. 100 pour Lund [23], 69 p. 100 pour Lütz [26].

TABLEAU V. — *Moraxella lwoffii* et *M. glucidolytica*.

NOMBRE DE SOUCHES	ANTIB.	C.M.I. ($\mu\text{g/ml}$)								
		0,5	1	2	4	8	16	32	64	R
	STREPTOMYCINE :									
98	M. lwoffii	6	8	20	9	4	3	4	.	44
89	M. glucid. ...	2	8	2	5	11	10	11	2	38
	TÉTRACYCLINE :									
98	M. lwoffii	38	23	25	9	1	2	.	.	.
89	M. glucid. ...	13	14	18	15	14	3	7	6	.
	COLISTINE :									
15	M. lwoffii	1	2	3	3	2	2	1	1	.
53	M. glucid. ...	3	17	30	3

L'association de ces deux derniers antibiotiques (streptomycine, tétracycline) est susceptible de donner des synergies de type bactéricide très nettes. Dans un cas de suppuration pulmonaire massive signalé par René Martin et coll. [28], cette action s'est vérifiée *in vivo* de façon spectaculaire. Pourtant le traitement des méningites ou des septicémies à *B. anitratum* a souvent été très décevant et la mortalité élevée, malgré des stérilisations apparentes (René Martin et coll. [27]).

Pratiquement les seuls antibiotiques réellement actifs *in vitro*, à la fois bactériostatiques et bactéricides, sont les antibiotiques de la famille des *polymyxines*. La toxicité du sulfate de polymyxine B a restreint considérablement son emploi, mais actuellement le *méthane sulfonate de colistine*, utilisable par voie générale, ouvre des possibilités nouvelles.

RÉSUMÉ.

1° Au point de vue thérapeutique, les *Pseudomonas*, B5W, *B. anitratum*, *Moraxella lwoffii* et *glucidolytica* sont sensibles aux antibiotiques de la famille des polymyxines. Parmi eux, le méthane sulfonate de colistine, peu toxique, est susceptible d'avoir un effet thérapeutique intéressant.

Tous ces groupes de bactéries comportent un pourcentage important de souches résistantes à la streptomycine. Les antibiotiques à large spectre et les sulfamides sont souvent bactériostatiques, mais peu bactéricides. Cependant dans certains cas, des associations de ces produits sont susceptibles d'être actives et doivent être étudiées dans chaque cas particulier.

2° L'action des antibiotiques apporte quelques éléments utilisables dans la détermination de leur position taxinomique.

a) La pigmentogénèse de *Ps. aeruginosa* peut être influencée par de nombreux antibiotiques.

b) *Ps. fluorescens* et les bactéries du « groupe *Maltophilia* » sont sensibles à divers antibiotiques. La comparaison des sensibilités de deux séries de souches de ces bactéries ne permet pas d'affirmer qu'il existe un lien entre elles.

c) Les *Achromobacter* et les *Moraxella* sont producteurs de pénicillinase. La sensibilité de la pénicilline, très variable, peut difficilement constituer un caractère taxinomique.

d) L'activité de l'érythromycine sur *Achromobacter*, B5W, *B. anitratum*, *Moraxella luoffi* et *glucidolytica*, *Mimae* et *Herellea*, quoique faible et peu intéressante au point de vue thérapeutique, montre que ces bactéries ont une position assez à part.

e) B5W, *Bacterium anitratum*, *Moraxella glucidolytica* non protéolytique et bactéries analogues, sont partiellement sensibles à l'érythromycine et à la novobiocine, sensibles aux tétracyclines et résistants au chloramphénicol. Cet « antibiotype » très particulier plaide en faveur d'une espèce très différenciée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRIEU (G.), MONNIER (J.) et BOURSE (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 322.
- [2] ARQUIÉ (F.), SUREAU (B.), BOYER (F.) et SAVIARD (M^{lle}). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 96.
- [3] BERTOYE (A.) et COURTIEU (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1412.
- [4] BOURSE (R.). *Thèse*, Toulouse, 1956, Cleder Imp., 132 p., 126 références.
- [5] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 86.
- [6] BROOKE (M. S.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1951, **28**, 338.
- [7] BROOKS (B. E.) et SANDERS (A. C.). *U. S. Arm. F. med. J.*, 1954, **5**, 667.
- [8] BUNN (P. A.), CANARILE (L.) et OSBORNE (W.). *Antib. Ann.*, 1953-1954, 279.
- [9] BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 43.
- [10] BUTTIAUX (R.), GAGNON (P.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958, **10**, 119.
- [11] CHABBERT (Y.). *Ann. Biol. clin.*, 1951, **9**, 544.
- [12] CHABBERT (Y.), TERRIAL (G.) et SCHUTZENBERGER (M. P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 952.
- [13] COURTIEU (A.-L.), MONNIER (J.-J.), LAJUDIE (P. DE) et GUILLERMET (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro d'avril, p. 14.
- [14] ENJALBERT (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 10.

- [15] FRANCK (P. J.), WILCOX (C.) et FINLAND (M.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **35**, 205.
- [16] GAGNON (P.). *Thèse Pharmacie*, Lille, 1959.
- [17] GOTS (J. S.). *Science*, 1945, **102**, 309.
- [18] GRABER (C. D.), TUMBUSCH (W. T.) et VOGEL (E. M. Jr). *Antib. Ann.*, 1959-1960, 77.
- [19] HENNEBERG (G.) et MULLER (E. M.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1954, **161**, 183.
- [20] JANBON (M.), GROS (C.), BERTRAND (L.), ROUX (J.) et TEMPLE (J.-P.). *Montpellier méd.*, 1953, **44**, 73.
- [21] LIGHTBROWN (J. W.). *J. gen. Microbiol.*, 1954, **11**, 477.
- [22] LINZENMEIER (G.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1955, **163**, 348.
- [23] LUND (E.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1954, **34**, 329.
- [24] LÜTZ (A.), GROOTEN (O.) et WITZ (M. A.). *Strasbourg méd.*, 1953, **4**, n° 9.
- [25] LÜTZ (A.), SCHAEFFER (A.) et HOFFERRER (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 49.
- [26] LÜTZ (A.), GROOTEN (O.), WITZ (M. A.) et SCHAEFFER (A.). *Strasbourg méd.*, 1958, **8**, 204.
- [27] MARTIN (René), SUREAU (B.), BARME (C.), LE MER (G.) et MOUS-SERT (M.). *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1950, **33**, 1764.
- [28] MARTIN (René), CHABBERT (Y.), SUREAU (B.), VÉRON (M.), MARTIN (L.). *XXX^e Congrès Fr. Méd.*, Alger, 1955, Masson, édit.
- [29] MOLLARET (L.) et WARLUZEL (Y.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1954, **138**, 310.
- [30] MONNIER (J.-J.) et QUERCY (J.). *XXX^e Congrès Fr. Méd.*, Alger, 1955, Masson, édit.
- [31] MOUSTARDIER (G.), BENTEGEAT (J.) et DURAND (B.). *Rev. Immunol.*, 1955, **19**, 109.
- [32] PELOUX (Y.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1959, **52**, 166.
- [33] PIÉCHAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 74.
- [34] SCHNEIERSON (S. S.), AMSTERDAM (D.) et PERLMAN (E.). *Antib. Chemoth.*, 1960, **10**, 30.
- [35] SHEWAN (J. M.), HODGKISS (W.), LISTON (J.). *Nature*, 1954, **73**, 208.
- [36] THIBAUT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 59.
- [37] VACCA (J. B.). *Antib. Chemoth.*, 1956, **6**, 130.
- [38] VÉRON (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, Suppl. au numéro de juin, p. 16.
- [39] WAISBREN (B. A.) et STRELITZER (C.). *Antib. Chemoth.*, 1960, **10**, 545.
- [40] WRIGHT (S. S.), POTEE (K. G.) et FINLAND (M.). *Amer. J. clin. Path.*, 1954, **24**, 1121.
- [41] YOW (E. M.) et TOWNSEND (E. S.). *Antib. Chemoth.*, 1953, **3**, 709.

DISCUSSION

Une discussion, à laquelle ont pris part plusieurs membres de la Société, a suivi l'exposé des rapports inscrits au programme du Colloque. Les principaux problèmes évoqués furent les suivants :

1° Il est important de bien définir les techniques d'étude employées pour attribuer à une souche un caractère donné.

En particulier, on ne peut parler de bactéries aérobies-anaérobies facultatives que si on obtient une culture en profondeur dans un milieu sans nitrate, certains germes aérobies pouvant cultiver en anaérobiose grâce à l'oxygène du nitrate. L'emploi de géloses profondes avec et sans nitrate est conseillé.

2° Toute classification est basée sur un certain nombre de caractères examinés simultanément. Certains sont particulièrement importants : la morphologie et la ciliature, l'aérobiose stricte ou facultative, le catabolisme des glucides par voie oxydative ou fermentative, la recherche de certaines enzymes comme la cytochrome-oxydase. Il est à noter que, parmi les bactéries étudiées au cours de ce Colloque, aucune ne possède un métabolisme fermentatif du glucose.

D'autres caractères comme la liquéfaction de la gélatine, la production de H_2S , l'attaque d'un glucide, qui sont des caractères variables notamment en fonction des techniques utilisées, ne peuvent servir qu'à subdiviser un groupe préalablement défini.

3° La nécessité d'inclure les *Serratia* (péritriches, aérobies-anaérobies facultatives, faisant fermenter le glucose et réduisant les nitrates en nitrites) dans les *Enterobacteriaceae* a été rappelée. Parmi les *Enterobacteriaceae*, à côté de nombreuses souches non pigmentées, il en existe certaines qui élaborent un pigment, par exemple dans les groupes *Escherichia* et *Cloaca*.

D'autre part, le fait d'appartenir aux *Enterobacteriaceae* ne peut exclure la possibilité, pour certaines souches, d'avoir un habitat normal en dehors de l'intestin.

4° La position taxinomique des *Erwinia* a été discutée. Le caractère phytopathogène qui leur est attribué n'est pas incompatible avec leur inclusion dans les *Enterobacteriaceae* dont elles possèdent les caractères généraux.

On sait, en effet, que certaines souches, après la perte de leurs enzymes pectinolytiques, cessent d'être phytopathogènes, devenant ainsi impossibles à distinguer d'authentiques *Enterobacteriaceae*, et que, d'autre part, on a pu rendre phytopathogènes des bactéries comme les *Cloaca* par passages successifs sur le concombre.

5° Il a été rappelé qu'il existe des communautés antigéniques entre les organismes très éloignés les uns des autres, et qu'une classification à l'échelle des genres ou des familles, basée seulement sur des communautés antigéniques, est illusoire.

6° M. Brisou pense toutefois qu'il est encore prématuré de modifier la systématique française traditionnelle et que rien n'empêche de lui rester fidèle. En effet, dans ce Colloque, seules certaines espèces microbiennes ont été envisagées, sur lesquelles il serait imprudent de généraliser. Il y a par exemple 130 espèces de *Pseudomonas* chromogènes à pigment diffusible ; or, ici deux seulement ont été étudiées : le classique *Ps. aeruginosa* et *Ps. fluorescens*. Chez les autres il existe des spécimens non oxydatifs, fermentatifs, qui n'en sont pas moins des *Pseudomonas* authentiques. On connaît aussi des *Serratia* sans action sur les sucres et les nitrates et qui cependant élaborent un magnifique pigment rouge. Une meilleure connaissance de la microbiologie comparée d'une part, la multiplication des tests biochimiques d'autre part, entraînent à des conclusions moins absolues. Il n'existe aucun test isolé qui puisse être pris en considération. On ne peut juger que sur un ensemble de caractères biochimiques, morphologiques et sérologiques. On ne doit pas négliger non plus les descriptions données par les traités. Les *Moraxella*, entre autres, sont avant tout des *Parvobacteriaceae* de la microflore endogène. Il ne faut pas confondre avec elles une flore ubiquitaire connue et décrite depuis très longtemps et qui appartient de l'avis de la grande majorité des bactériologistes à la tribu des *Achromobacteraeae*. Il faut éviter de décrire sous des vocables non conformes aux règles de la taxinomie des espèces déjà décrites et bien connues. Des échanges de souches étudiées avec les mêmes méthodes sont souhaitables. Enfin, il est bien entendu que les parentés antigéniques entre les bactéries doivent être interprétées avec prudence. Toutefois, lorsque les réactions croisées se produisent avec une fréquence de 60 à 70 p. 100 entre certains groupes microbiens et que ces parentés concordent avec la taxinomie, on est en droit d'en tenir compte, tout en sachant que là encore il n'y a rien d'absolu.

7° Un point de vue sur la classification des *Moraxella* a été présenté (M. Courtieu) ; il est rapporté ci-après.

**CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES DE 214 SOUCHES DE MORAXELLA LWOFFI
ET DE M. GLUCIDOLYTICA (ACINETOBACTER)**

par A.-L. COURTIEU, Suzanne CHASSIGNOL et Cécile LONGERAY.

(Institut Pasteur de Lyon)

A l'occasion d'examens de produits pathologiques divers effectués au Service de Microbiologie, un certain nombre de souches microbiennes ressemblant aux *Moraxella* et non classables parmi les Entérobactéries ont été rencontrées. Nous avons sélectionné pour cette étude les germes répondant aux critères suivants : bacilles (souvent polymorphes), immobiles, Gram-négatifs, aérobies stricts, se développant sur milieux simples, ne réduisant pas les nitrates en nitrites et dont les colonies sur les divers milieux ne sont pas pigmentées et ne possèdent pas de pigment diffusible.

Nous avons ainsi pu réunir 186 souches. Elles présentent toutes un certain nombre de caractères communs. Outre ceux qui ont servi à les sélectionner, on peut retenir les suivants : pousse à 37°, polymorphisme des germes, formes courtes, coccoïdes, formes longues même filamenteuses, mêlées ou non dans une même culture, existence de chaînettes courtes de cocci ou de coccobacilles sur les milieux liquides, colonies convexes souvent muqueuses, pas d'acidification de divers sucres (lévulose, saccharose, maltose, tréhalose, mannitol et lactose à la concentration de 1 p. 100), pas de formation d'indole ni d'hydrogène sulfuré, réactions du rouge de méthyle et de Voges-Proskauer négatives, pas de pousse en eau peptonée à 6,5 p. 100 de ClNa ni sur milieu de Chapman, pousse sur milieu de Kristensen-Kauffmann et sur milieu de Pike solide utilisé normalement pour la culture des streptocoques, enfin test des oxydases négatif et présence d'une catalase.

A ces 186 souches personnelles nous avons joint, à titre de comparaison, 28 souches de provenance extérieure, présentant les mêmes caractères que les nôtres : 10 souches de *Bacterium anitratum* (M^{me} Erna Lund, Copenhague), 5 souches de *Mima polymorpha* et 6 souches de *Herellea vaginicola* (Miss Elizabeth

O. King, Chamblee), 1 souche de *Neisseria winogradskyi* (Dr Lemoigne, Paris), 5 souches de *Diplococcus mucosus* (H. P. R. Seeliger, Bonn), 1 souche de *B. anitratum* var. *saponiphilum*

Nos propres souches avaient été isolées des produits pathologiques suivants :

L. C.-R.	27
Expectorations	48
Aspirations bronchiques	47
Tubages gastriques	13
Hémocultures	10
Urines	11
Pus (divers)	11
Liquides pleuraux	3
Nez, gorge	3
Divers	8

Y sont jointes : 5 souches isolées d'eau de boisson.

RÉSULTATS.

Les techniques et les milieux utilisés pour cette étude sont décrits en détail dans la thèse de Suzanne Chassignol [8]. Il serait trop long de les reprendre ici.

Tous les caractères décrits ci-dessus ont été concordants pour toutes les souches quelle que fût leur provenance. Les autres tests ont montré des réactions différentes. En premier lieu un certain nombre de souches sont capables d'acidifier les milieux contenant les sucres suivants : glucose, galactose, xylose, arabinose, dextrine et lactose (à la concentration de 10 p. 100). Le glucose est toujours acidifié sans production de gaz. La présence ou non de cette propriété glucidolytique permet donc de diviser ces germes en deux groupes : les non glucidolytiques, qui se rapprochent des *Alcaligenes* immobiles et correspondent à la description de *Moraxella lwoffii* d'Alice Audureau [2] et de *Mima polymorpha* de De Bord [3], les glucidolytiques qui se confondent avec *Bacterium anitratum* de Schaub et Hauber [22], B5W de Stuart [25], *Herellea vaginicola* de De Bord [3], et *Moraxella glucidolytica* de Piéchaud [20].

En étudiant le pouvoir protéolytique, on s'aperçoit qu'il est encore possible de subdiviser chacun de ces deux groupes en deux sous-groupes, suivant que les germes attaquent ou non les protéines. Pour cela, nous avons recherché leur action sur la gélatine (méthode de Frazier), sur la caséine (gélase à 30 p. 100 de lait écrémé), sur le sérum coagulé (milieu de Loeffler) et sur l'œuf

coagulé. Toutes les souches qui hydrolysent rapidement la gélatine attaquent aussi les autres protéines (à part quelques exceptions n'intéressant qu'un seul milieu sur les quatre utilisés). Toutes les souches n'hydrolysant pas la gélatine en quatre jours sont sans action sur les autres protéines (quelques souches attaquent le milieu à l'œuf plus ou moins rapidement).

Ce caractère protéolytique paraît très important. Il est constant pour une même souche. Quelques-unes des nôtres isolées depuis plus de cinq ans le conservent encore intact. Il est donc tout à fait légitime d'accorder leur autonomie à de tels germes, comme Piéchaud [21] le premier l'avait suggéré.

Les autres tests pratiqués ont fourni des réponses moins homogènes qui ne se recoupent pas tout à fait avec les divisions ou subdivisions précédentes. Ils ne permettent pas, en tous cas, de créer de nouvelles subdivisions. Une uréase peut être observée ; elle paraît plus fréquente chez les souches glucidolytiques, non protéolytiques. La pousse sur le milieu au citrate de Simmons, même sans alcalinisation du milieu, est assez constante surtout pour les souches protéolytiques (1 seule exception sur 38 souches). La pousse sur le milieu S. S. (*Salmonella-Shigella*) est plus facile pour les souches glucidolytiques, surtout si elles sont aussi protéolytiques. L'action sur le lait (lait écrémé, additionné de 20 ml de solution au 1/500 de rouge de phénol par litre) est très variable : les souches afermentaires le coagulent rarement, mais l'alcalinisent très souvent ; les souches glucidolytiques le coagulent et l'acidifient le plus souvent (surtout si elles sont protéolytiques). L'hémolyse sur gélose à 5 p. 100 de sang de cheval est presque constante, puisque seules 6 souches ne se sont pas montrées hémolytiques après quatre jours d'observation ; sur le milieu de Pike solide au sang de cheval, l'hémolyse est souvent plus rapide à se manifester et seules 4 souches n'hémolysent pas en quatre jours. Sur milieu de Bordet-Gengou à 20 p. 100 de sang de mouton, peu de souches sont hémolytiques, mais toutes brunissent ou noircissent le milieu. L'hémolyse de nos souches sur ces trois milieux a parfois montré autour de la colonie, des zones alternées d'hémolyse, séparées par des bandes de milieu intact et formant de véritables cocardes.

L'ensemble des caractères observés pour toutes nos souches concorde avec ceux donnés par les différents auteurs suivants : Mary-Ann Aiken [1], Brooke [7], Ferguson [10], Linzenmmeier [16], Lütz [17], Piéchaud [20, 21], Simpson [24], Isabelle Schaub [22] et Vassiliadis [26], qui ont étudié un grand nombre de souches de provenances diverses, surtout d'urines, d'expectorations, de L. C.-R., de pus, etc.

TABLEAU I.

	<i>Moraxella lwoffii</i> non protéolytique 93 souches			<i>Moraxella lwoffii</i> protéolytique 10 souches			<i>Moraxella glucidolytica</i> non protéolytique 83 souches			<i>Moraxella glucidolytica</i> protéolytique 28 souches		
	+	O	NT	+	O	NT	+	O	NT	+	O	NT
Glucose		92	1		10		83			28		
Galactose		92	1		10		83			28		
Arabinose		92	1		10		81		2	28		
Xylose		91	2		10		79		4	28		
Dextrine		91	2		10		81	1	1	25		3
Lactose 10 %		91	2		10		83			28		
Caséine		93		10				83		24	3	1
Œuf	1	92		10			10		11	27	1	
Sérum coagulé		92	1	10				82	1	27	1	
Gélatine		87	6	10				57	26	18	3	7
Uréase	1	92			10		11	71	1	1	26	1
Citrate	72	11		10			73	9	1	27	1	
Pousse sur S.S.	28	64	1	9	1		36	45	2	23	5	
Lait { inchangé alcalin acide coagulé		23						11				
	68	1		10			3	26		2	9	
	1	1					46	26		17	9	
	4	64		9	1		61	11		25	3	

+ : Réaction positive (1 à 10 jours).

O : Réaction négative en 10 jours (sauf uréase, S.S. et protéolyse : 4 jours).

NT : Non pratiqué.

DISCUSSION.

La parenté de ces germes avec les *Moraxella* telles que les a définies Lwoff [18] est évidente sur le plan morphologique. C'est naturellement dans cette voie qu'Alice Audureau [2] décrit des souches afermentaires sous le nom de *Moraxella lwoffii* et que plus tard Piéchaud [20] ajoute les souches saccharolytiques qu'il nomme *Moraxella glucidolytica*. Henriksen [41], en 1952, estime que ces deux espèces sont fort différentes de *M. lacunata* et de *M. duplex* par leurs caractères culturels, qu'il est difficile de les éliminer du genre et que des études complémentaires sont nécessaires. Puis, en 1960, le même auteur [42] les élimine du genre *Moraxella*. Cependant les études de Murray et Truant [49], en 1954, sur la structure des diverses *Moraxella* confirmaient les grandes analogies entre les souches de Lwoff et celles d'Alice Audureau et de Piéchaud. Ces auteurs pensaient que toutes pouvaient coexister dans le même genre. Les résultats du test des oxydases pouvaient permettre de les distinguer les unes des autres, comme l'a montré Piéchaud [21].

D'un autre côté, l'identité de *M. lwoffii* avec *Mima polymorpha*, puis de *M. glucidolytica* avec *Bacterium anitratum*, B5W, *Herellea vaginicola* a été confirmée par Ewing [9], Piéchaud [20], Henriksen [41], Brisou [4]. Enfin, Seeliger [23] signale en 1953 que les bactériologistes allemands actuels décrivent sous le nom de *Diplococcus mucosus* des germes analogues à *B. anitratum*, mais aussi des souches afermentaires qui correspondent à *M. lwoffii*. Il conseille de réunir ces dernières à l'espèce *Alcaligenes metalcaligenes*. *Diplococcus mucosus* isolé de méningites purulentes, a été décrit en 1906 par von Lingelsheim [15]. La description de ses caractères est pauvre et il est impossible d'y reconnaître les germes qui nous intéressent ici. D'ailleurs, Véron [27], en 1959 change le nom *D. mucosus* en celui de *Neisseria mucosa*, ce qui est tout à fait logique.

Comme le constataient Murray et Truant, s'il est facile de dire à quel groupe n'appartiennent pas les *Moraxella*, il devient très difficile de savoir à quel groupe les rattacher. S'il s'agit des seules espèces admises par Lwoff, puis par Henriksen, l'appartenance à la famille des *Parvobacteriaceae* ou des *Brucellaceae* est conservée par le Bergey's Manual. Les autres espèces sont plus encombrantes. Brisou [5], dès 1953, propose de les joindre au genre *Achromobacter*, puis, en 1954, le même auteur [6] crée le genre *Acinetobacter* qui réunit les espèces immobiles du genre *Achromobacter*. A plusieurs reprises, Brisou a précisé la nomenclature des *Acinetobacter* et les quatre groupes de nos germes

(afermentaires protéolytiques et non protéolytiques, glucidolytiques protéolytiques et non protéolytiques) s'y retrouvent sous divers noms d'espèces. Il n'est malheureusement pas possible de suivre entièrement le point de vue de Brisou. Son genre *Acinetobacter* comprend des espèces anaérobies facultatives et aérobies strictes, indologènes ou non, réductrices ou non des nitrates, productrices ou non d'H₂S, etc. Leur seul point commun semble en réalité l'impossibilité de les classer dans d'autres groupes de bactéries. Klinge [13, 14], en 1958, puis en 1959, considère le genre *Acinetobacter* comme superflu, mais range *M. lwoffii* dans le genre *Alcaligenes* et *M. glucidolytica* dans le genre *Achromobacter*.

Nous pensons quant à nous que, du moins provisoirement, ces deux espèces doivent rester dans le genre *Moraxella*, mais nous estimons que les variétés protéolytiques peuvent être transformées en espèces. Le test des oxydases permettant de reconnaître deux groupes dans les *Moraxella*, il serait peut-être souhaitable de créer une nouvelle tribu *Moraxelleae* groupant les *Moraxella* de Lwoff qui sont oxydase-positives et un autre genre *Mima* ou *Herellea*, par exemple, comprenant les germes que nous étudions ici et qui sont oxydase-négatifs.

Dans l'état actuel des choses nous pourrions reconnaître dans le nouveau genre, ou tout au moins dans le groupe II des *Moraxella* de Piéchaud [21] qui sont oxydase-négatives, les quatre espèces suivantes, en respectant les règles d'antériorité :

Non glucidolytiques :

- non protéolytiques : *Moraxella* (provisoire) *lwoffii* ;
- protéolytiques : *Moraxella* (provisoire) *caseolytica* (nov. sp.).

Glucidolytiques :

- non protéolytiques : *Moraxella* (provisoire) *vaginicola*.
- protéolytique : *Moraxella* (provisoire) *saponiphilum* (sauf si les souches décrites par Eva Billing n'étaient reconnues que comme une variété résistante aux savons).

CONCLUSIONS.

De notre étude et de la discussion qui a suivi, il est prématuré de tirer une conclusion définitive. Les travaux doivent se multiplier pour apporter des arguments complémentaires importants, qui permettront peu à peu d'aborder les véritables problèmes de classification qui ne sont encore qu'ébauchés pour de tels germes.

RÉSUMÉ.

Description de nombreux caractères bactériologiques de 214 souches classées comme *Moraxella lwoffii* et *Moraxella glucidolytica* ; 186 ont été isolées par les auteurs et sont comparées à 28 souches fournies par d'autres chercheurs. Les caractères essentiels permettent de reconnaître quatre groupes : les souches afermentaires d'une part et les souches glucidolytiques de l'autre, chacune pouvant à nouveau être subdivisée en souches protéolytiques et en souches non protéolytiques. Leur classement dans le genre *Moraxella*, créé par Lwoff, revêt un caractère provisoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AIKEN (M. A.), WARD (M. K.) et KING (E. O.). *Publ. Hlth Rep.*, 1956, **14**, 126-136.
- [2] AUDUREAU (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **64**, 126-166.
- [3] BORD (G. G. DE). *Iowa State Coll. J. Sci.*, 1942, **16**, 471-480.
- [4] BRISOU (J.) et MORICHAU-BEAUCHANT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 640-643.
- [5] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 812-814.
- [6] BRISOU (J.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 722-728.
- [7] BROOKE (M. S.). *Acta pathol. microbiol. scand.*, 1951, **28**, 338-342.
- [8] CHASSIGNOL (Suzanne). *Thèse Médecine*, Lyon, 1961.
- [9] EWING (W. H.). *J. Bact.*, 1949, **57**, 659.
- [10] FERGUSON (W. W.) et ROBERTS (L. F.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 171-183.
- [11] HENRIKSEN (S. D.). *J. gen. Microbiol.*, 1952, **6**, 318-328.
- [12] HENRIKSEN (S. D.). *Intern. Bull. Bact. Nomen. Taxon.* 1960, **10**, 23-28.
- [13] KLINGE (K.). *Arch. Hyg.*, 1957, **141**, 563-577.
- [14] KLINGE (K.). *Arch. Hyg.*, 1958, **142**, 171-179.
- [15] LINGELSHEIM (W. von). *Klin. Jahrb.*, 1906, **15**, 373-488.
- [16] LINZENMEIER (G.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1955, **163**, 348-352.
- [17] LUTZ (A.), GROOTEN (O.), VELU (H.) et VELU (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 413-417.
- [18] LWOFF (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 168-176.
- [19] MURRAY (R. G. E.) et TRUANT (J. P.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 13-22.
- [20] PIÉCHAUD (D.), PIÉCHAUD (M.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 97-99.
- [21] PIÉCHAUD (D.), PIÉCHAUD (M.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 517.
- [22] SCHAUB (I. G.) et HAUBER (F. D.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 379-385.
- [23] SEELIGER (H. P. R.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1953, **159**, 173-176.
- [24] SIMPSON (M. A.) et CROSSLEY (V. M.). *Canad. J. publ. Hlth*, 1954, **45**, 259-263.
- [25] STUART (C. A.), FORMAL (S.) et MAC GANN (V.). *J. Inf. Dis.*, 1949, **84**, 235-239.
- [26] VASSILIADIS (P.) et MAQUET (R.). *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1959, **39**, 515-524.
- [27] VÉRON (M.), THIBAULT (P.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 497-510.